

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**APLICAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS PARA O  
APRIMORAMENTO DAS PROPRIEDADES DE FILMES  
BIODEGRADÁVEIS À BASE DE GELATINA**

**Victória Hermes de Vargas**

**Porto Alegre, RS, Brasil.  
2022**

**VICTÓRIA HERMES DE VARGAS**

**APLICAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS PARA O APRIMORAMENTO DAS  
PROPRIEDADES DE FILMES BIODEGRADÁVEIS À BASE DE GELATINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lígia Damasceno Ferreira Marczak  
Co-orientadora(s): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Giovana Domeneghini Mercali  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Simone Hickmann Flôres

**Porto Alegre, RS, Brasil.  
2022**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação *Aplicação de diferentes estratégias para o aprimoramento das propriedades de filmes biodegradáveis à base de gelatina*, elaborada por Victória Hermes de Vargas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Comissão Examinadora:

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jordana Corralo Spada**  
DEQUI / UFRGS

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Liliane Damaris Pollo**  
PPGEQ / UFRGS

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz**  
PPGEAL / UFSC

## RESUMO

Filmes biodegradáveis, desenvolvidos a partir de biopolímeros, são uma alternativa sustentável para substituição de plásticos convencionais derivados do petróleo. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver filmes biodegradáveis a partir de resíduos gelatinosos e investigar os efeitos de diferentes tecnologias emergentes, como aquecimento ôhmico, ultrassom e radiação ultravioleta, em suas propriedades e estrutura. Os efeitos da incorporação de nanofibras de celulose bacteriana às soluções filmogênicas também foram investigados. Os filmes desenvolvidos foram caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas, mecânicas, térmicas, ópticas, estruturais, morfológicas, de barreira e de biodegradabilidade. Todos os filmes à base de gelatina apresentaram superfície homogênea, coloração amarelada, alta transparência e barreira à luz ultravioleta. A incorporação de nanofibras afetou principalmente às propriedades físico-químicas e de barreira, em que se observou redução significativa da solubilidade e permeabilidade ao vapor d'água. Os filmes tratados por aquecimento ôhmico e ultrassom apresentaram uma estrutura mais ordenada, com maior índice de cristalinidade, além de serem mais estáveis termicamente. As propriedades mecânicas foram aprimoradas pelas três tecnologias empregadas, com resultados mais pronunciados para o filme produzido por aquecimento ôhmico, que apresentou os maiores valores de resistência à tração e de módulo de Young. Independentemente da técnica aplicada, todas as amostras perderam sua integridade após 12 dias de incubação no solo, comprovando sua suscetibilidade à ação de microrganismos. A espessura e o teor de umidade dos filmes não foram afetados por nenhum tratamento. De modo geral, todas as estratégias empregadas contribuíram para o aprimoramento das propriedades dos filmes, indicando que essas tecnologias representam uma abordagem interessante para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis à base de gelatina.

**Palavras-chave:** gelatina; filmes biodegradáveis; aquecimento ôhmico; ultrassom; radiação ultravioleta; nanofibras; celulose bacteriana; embalagem.

## ABSTRACT

Biodegradable films developed from biopolymers are a sustainable alternative for replacing conventional petroleum-based plastics. In this context, the present study aimed to develop biodegradable films from gelatinous residues and investigate the effects of different emerging technologies, such as ohmic heating, ultrasound and ultraviolet radiation, on their properties and structure. The effects of bacterial cellulose nanofibers incorporation into filmogenic solutions were also investigated. The developed films were characterized for their physical-chemical, mechanical, thermal, optical, structural, morphological, barrier and biodegradability properties. The gelatin-based films presented a homogeneous surface, yellowish color, high transparency and barrier to ultraviolet light. The incorporation of nanofibers mainly affected the physical-chemical and barrier properties, a significant decrease in water solubility and water vapor permeability was observed. Films produced by ohmic heating and ultrasound showed a more ordered structure, with a higher crystallinity index, and were more thermally stable. The mechanical properties were improved by all technologies employed, with more pronounced results for the film produced by ohmic heating, which presented the highest values of tensile strength and Young's modulus. Regardless of the applied technique, all samples lost their integrity after a 12-day soil burial experiment, proving their susceptibility to the action of microorganisms. Film thickness and moisture content were not affected by any treatment. Overall, all the strategies contributed to the improvement of film properties, suggesting that these technologies represent an interesting approach for the development of gelatin-based biodegradable films.

**Keywords:** gelatin; biodegradable films; ohmic heating; ultrasound; ultraviolet radiation; nanofibers; bacterial cellulose; packaging.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Classificação dos polímeros biodegradáveis. ....	21
<b>Figura 2</b> - Curva característica da resistência à tração versus deformação. ....	29
<b>Figura 3</b> - Esquema representativo de um sistema de aquecimento ôhmico. ....	36
<b>Figura 4</b> - Esquema representativo: banho (a) e sonda ultrassônica (b). ....	39
<b>Figura 5</b> - Esquema representativo de aplicação de radiação UV. ....	43
<b>Figura 6</b> - Celulose bacteriana: película gelatinosa (a), hidrogel (b), MEV da superfície plana (c) e MEV da seção transversal (d). ....	47
<b>Figura 7</b> - Resíduos gelatinosos do processamento de cápsulas nutracêuticas. ....	49
<b>Figura 8</b> - Diagrama de elaboração dos filmes à base de gelatina. ....	50
<b>Figura 9</b> - Filmes armazenados em dessecador contendo solução saturada de NaBr. ....	51
<b>Figura 10</b> - Aparato experimental de aplicação de aquecimento ôhmico. ....	52
<b>Figura 11</b> - Célula ôhmica com eletrodos e termopares. ....	53
<b>Figura 12</b> - Aparato experimental de aplicação do ultrassom. ....	54
<b>Figura 13</b> - Câmara utilizada para a aplicação de radiação UV. ....	55
<b>Figura 14</b> - Aparência visual do SCOBY: bruto (a) e após etapa de purificação (b). ....	56
<b>Figura 15</b> - Medição da espessura dos filmes com micrômetro digital. ....	59
<b>Figura 16</b> - Análise de permeabilidade em cuba contendo solução saturada de NaCl. ....	60
<b>Figura 17</b> - Análise das propriedades mecânicas realizada em texturômetro. ....	61
<b>Figura 18</b> - Medição dos parâmetros de cor dos filmes com colorímetro. ....	62
<b>Figura 19</b> - Análise de estabilidade térmica em analisador termogravimétrico. ....	64
<b>Figura 20</b> - Filmes submetidos à análise de biodegradabilidade. ....	65
<b>Artigo 1 - Effect of ohmic heating and ultrasound on functional properties of biodegradable gelatin-based films</b>	
<b>Figure 1</b> - Temperature profiles of the gelatin-based film-forming solutions: control (12.5 min), OH (ohmic heating at 75 V and 12.5 minutes), and US (ultrasound at 75% and 12.5 minutes). ....	72
<b>Figure 2</b> - Surface response for a) tensile strength (TS) and b) Young's modulus (YM) as a function of exposure time (min) and electric field strength (V). ....	78
<b>Figure 3</b> - Surface response for a) tensile strength (TS) and b) Young's modulus (YM) as a function of exposure time (min) and US intensity (%). ....	81

<b>Figure 4</b> - X-ray diffraction patterns of gelatin-based films produced by different technologies. .....	85
<b>Figure 5</b> - Thermogravimetric graphs of gelatin-based films produced by different technologies. ....	86
<b>Figure 6</b> - Visual appearance of gelatin-based films produced by different technologies. ....	89
<b>Figure 7</b> - SEM microphotographs (at 1000 magnification) of gelatin-based films surfaces.	91
<b>Figure 8</b> - Fourier transform infrared spectra of gelatin-based films produced by different technologies. ....	92

**Artigo 2 - Morphology and functional properties of gelatin-based films modified by UV radiation and bacterial cellulose nanofibers**

<b>Figure 1</b> - SEM microphotographs (at 1000 magnification) of gelatin-based films surface: control, treated by UV radiation, and reinforced with bacterial cellulose (BC) nanofibers. ...	118
<b>Figure 2</b> - Thermogravimetric graphs of gelatin-based films: control, and treated by UV radiation at different exposure times (UV0.5, UV1, and UV2). ....	119
<b>Figure 3</b> - Typical Fourier transform infrared spectra of gelatin-based films. ....	121
<b>Figure 4</b> - Macroscopic aspect of the gelatin-based films prior and after 12 days of incubation in soil. ....	122

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Delineamento experimental para a aplicação de aquecimento ôhmico.....	58
<b>Tabela 2</b> - Delineamento experimental para aplicação do ultrassom. ....	58
<b>Tabela 3</b> - Efeitos das diferentes técnicas nas propriedades dos filmes à base de gelatina...	132

### **Artigo 1 - Effect of ohmic heating and ultrasound on functional properties of biodegradable gelatin-based films**

<b>Table 1</b> - Full-factorial $2^2$ central composite design and responses for ohmic heating application. ....	77
<b>Table 2</b> - Full-factorial $2^2$ central composite design and responses for ultrasound application. ....	80
<b>Table 3</b> - Thickness (FT), moisture content (MC), water solubility (WS), tensile strength (TS), elongation at break (EAB), Young's modulus (YM), water vapor permeability (WVP), color parameters ( $L^*$ , $a^*$ and $b^*$ ), and color difference ( $\Delta E$ ) of gelatin-based films produced by different technologies. ....	83
<b>Table 4</b> - Thermal degradation temperature ( $T_{donset}$ ), weight loss ( $\Delta w$ ), and residues for each stage of gelatin-based films produced by different technologies. ....	85
<b>Table 5</b> - Light transmission and opacity values of gelatin-based films produced by different technologies. ....	90
<b>Table 6</b> - Weight loss as a function of the exposure time to soil burial for gelatin-based films produced by different technologies. ....	93

### **Artigo 2 - Morphology and functional properties of gelatin-based films modified by UV radiation and bacterial cellulose nanofibers**

<b>Table 1</b> - Samples incorporated with bacterial cellulose (BC) nanofibers. ....	107
<b>Table 2</b> - Moisture content (MC), water solubility (WS), and water vapor permeability (WVP) of gelatin-based films: control, treated by UV radiation, and reinforced with bacterial cellulose (BC) nanofibers. ....	112
<b>Table 3</b> - Film thickness (FT), tensile strength (TS), elongation at break (EB), and Young's Modulus (YM) of gelatin-based films: control, treated by UV radiation, and reinforced with bacterial cellulose (BC) nanofibers. ....	114



**Table 4** - Color parameters ( $L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$ ), color difference ( $\Delta E$ ), and opacity of gelatin-based films: control, treated by UV radiation, and reinforced with bacterial cellulose (BC) nanofibers.

..... 116

**Table 5** - Thermal degradation temperature ( $T_{\text{donset}}$ ), weight loss ( $\Delta w$ ), and residues for each stage of gelatin films: control, and treated by UV radiation at different exposure times..... 119

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1 - Introdução</b> .....	<b>16</b>
<b>Capítulo 2 - Objetivos</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>18</b>
<b>Capítulo 3 - Fundamentação teórica e revisão bibliográfica</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1 Embalagens alimentícias</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2 Polímeros biodegradáveis</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3 Filmes biodegradáveis</b> .....	<b>22</b>
3.3.1 Filmes biodegradáveis à base de gelatina.....	24
<b>3.4 Propriedades e caracterização de filmes biodegradáveis</b> .....	<b>26</b>
3.4.1 Propriedades físico-químicas.....	26
3.4.2 Propriedades de barreira .....	27
3.4.3 Propriedades mecânicas.....	28
3.4.4 Propriedades ópticas .....	29
3.4.5 Propriedades estruturais e morfológicas.....	30
3.4.6 Propriedades térmicas.....	31
3.4.7 Biodegradabilidade .....	32
<b>3.5 Produção de filmes biodegradáveis por <i>casting</i></b> .....	<b>32</b>
<b>3.6 Tecnologias emergentes para aplicação em filmes</b> .....	<b>34</b>
3.6.1 Aquecimento ôhmico.....	34
3.6.1.1 Efeito do aquecimento ôhmico nas propriedades de filmes .....	37
3.6.2 Ultrassom.....	38
3.6.2.1 Efeito do ultrassom nas propriedades de filmes .....	40
3.6.3 Radiação ultravioleta .....	41
3.6.3.1 Efeito da radiação ultravioleta nas propriedades de filmes .....	43
<b>3.7 Filmes nanocompósitos</b> .....	<b>44</b>

3.7.1 Nanofibras de celulose bacteriana .....	45
<b>Capítulo 4 - Materiais e Métodos .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1 Materiais.....</b>	<b>49</b>
<b>4.2 Caracterização dos resíduos gelatinosos.....</b>	<b>49</b>
<b>4.3 Obtenção dos filmes à base de gelatina por <i>casting</i>.....</b>	<b>50</b>
4.3.1 Tratamento da solução por aquecimento ôhmico .....	52
4.3.2 Tratamento da solução por ultrassom.....	53
4.3.3 Tratamento da solução por radiação ultravioleta.....	54
4.3.4 Filme produzido por aquecimento convencional.....	55
<b>4.4 Filmes reforçados com nanofibras de celulose bacteriana .....</b>	<b>56</b>
4.4.1 Obtenção das nanofibras.....	56
4.4.2 Obtenção dos filmes reforçados com nanofibras.....	56
<b>4.5 Planejamento experimental .....</b>	<b>57</b>
<b>4.6 Caracterização dos filmes biodegradáveis .....</b>	<b>59</b>
4.6.1 Propriedades físico-químicas.....	59
4.6.1.1 Espessura .....	59
4.6.1.2 Umidade e solubilidade em água.....	59
4.6.2 Permeabilidade ao vapor d'água.....	60
4.6.3 Propriedades mecânicas.....	61
4.6.4 Propriedades ópticas .....	61
4.6.4.1 Cor .....	61
4.6.4.2 Transmitância e opacidade .....	62
4.6.5 Propriedades estruturais e morfológicas.....	63
4.6.5.1 Microscopia eletrônica de varredura .....	63
4.6.5.2 Difração de raio X .....	63
4.6.5.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....	63
4.6.6 Propriedades térmicas.....	63

4.6.7 Biodegradabilidade .....	64
<b>4.7 Análise estatística.....</b>	<b>65</b>
<b>Capítulo 5 - Resultados .....</b>	<b>66</b>
<b>Artigo 1 - Effect of ohmic heating and ultrasound on functional properties of biodegradable gelatin-based films.....</b>	<b>66</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>67</b>
<b>1 Introduction .....</b>	<b>68</b>
<b>2 Materials and methods.....</b>	<b>70</b>
2.1 Materials .....	70
2.2 Film preparation .....	70
2.2.1 Ohmic heating application.....	70
2.2.2 Ultrasound application.....	71
2.2.3 Conventional heating application .....	71
2.3 Experimental design .....	72
2.4 Film characterization .....	73
2.4.1 Film thickness.....	73
2.4.2 Moisture content and water solubility .....	73
2.4.3 Water vapor permeability .....	73
2.4.4 Mechanical properties.....	74
2.4.5 Color .....	74
2.4.6 Light transmission and opacity.....	74
2.4.7 X-ray diffraction .....	75
2.4.8 Thermogravimetric analysis .....	75
2.4.9 Film surface characteristics .....	75
2.4.10 Fourier transformation infrared .....	75
2.4.11 Indoor soil burial biodegradation .....	75
2.5 Statistical analyses.....	76

<b>3 Results and discussion</b> .....	<b>76</b>
3.1 Effect of ohmic heating application on film properties.....	76
3.2 Effect of ultrasound application on film properties.....	79
3.3 Non-thermal effects of ohmic heating and ultrasound on film properties.....	82
3.3.1 Film thickness.....	83
3.3.2 Moisture content and water solubility .....	83
3.3.3 X-ray diffraction.....	84
3.3.4 Thermogravimetric analysis .....	85
3.3.5 Mechanical properties.....	87
3.3.6 Water vapor permeability .....	88
3.3.7 Color.....	89
3.3.8 Light transmission and opacity.....	89
3.3.9 Film surface characteristics .....	90
3.3.10 Fourier transformation infrared .....	91
3.3.11 Indoor soil burial biodegradation .....	92
<b>4 Conclusions</b> .....	<b>93</b>
<b>Acknowledgments</b> .....	<b>94</b>
<b>References</b> .....	<b>94</b>
<b>Artigo 2 - Morphology and functional properties of gelatin-based films modified by UV radiation and bacterial cellulose nanofibers</b> .....	<b>102</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>103</b>
<b>1 Introduction</b> .....	<b>104</b>
<b>2 Materials and methods</b> .....	<b>106</b>
2.1 Materials .....	106
2.2 Gelatin solutions treated by UV radiation .....	106
2.3 Gelatin solutions reinforced with bacterial cellulose nanofibers.....	107
2.3.1 Nanofibers preparation .....	107

2.3.2 Preparation of the nanocomposite film-forming solutions .....	107
2.4 Film casting and conditioning .....	107
2.5 Film characterization .....	108
2.5.1 Film thickness.....	108
2.5.2 Moisture content and water solubility .....	108
2.5.3 Water vapor permeability .....	108
2.5.4 Mechanical properties.....	109
2.5.5 Color .....	109
2.5.6 Light transmission and opacity.....	109
2.5.7 Thermogravimetric analysis .....	110
2.5.8 Film surface characteristics .....	110
2.5.9 Fourier transformation infrared .....	110
2.5.10 Indoor soil burial biodegradation .....	110
2.6 Statistical analyses .....	111
<b>3 Results and discussion .....</b>	<b>111</b>
3.1 Water-related properties .....	111
3.2 Film thickness and mechanical properties.....	113
3.3 Optical properties .....	115
3.4 Film surface characteristics .....	117
3.5 Thermogravimetric analysis .....	119
3.6 Fourier transformation infrared .....	120
3.7 Indoor soil burial biodegradation .....	122
<b>4 Conclusions .....</b>	<b>123</b>
<b>Acknowledgments.....</b>	<b>123</b>
<b>References.....</b>	<b>123</b>
<b>Capítulo 6 - Discussão geral e conclusões.....</b>	<b>131</b>
<b>Capítulo 7 - Perspectivas para trabalhos futuros.....</b>	<b>135</b>

<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>136</b>
---	------------

## Capítulo 1 - Introdução

A importância das embalagens de alimentos aumentou significativamente nos últimos anos devido à mudança de uma sociedade baseada na autossuficiência rural para a atual sociedade que se baseia em alimentos altamente industrializados. As embalagens alimentícias são utilizadas como ferramentas de marketing, para facilitar o armazenamento e o transporte, além de tornar prático o manuseio dos alimentos pelos consumidores. Entretanto, o foco principal tem sido constantemente a proteção dos alimentos contra os efeitos de deterioração causados pelo ambiente externo, com o intuito de garantir segurança alimentar e ampliar a vida útil dos produtos embalados.

O uso de polímeros sintéticos derivados do petróleo tem sido a solução mais prática e econômica para aplicações em embalagem devido à sua grande disponibilidade, baixo custo e características funcionais favoráveis, como boas propriedades mecânicas, ópticas e de barreira, além de ótima vedação térmica. Apesar das inúmeras vantagens, os polímeros sintéticos não são biodegradáveis e podem causar sérios problemas ambientais associados ao acúmulo de seus resíduos. Nesse contexto, filmes biodegradáveis, desenvolvidos a partir de biopolímeros (proteínas, polissacarídeos e/ou lipídeos), são alternativas sustentáveis para substituição dos plásticos convencionais. Dentre os biopolímeros, a gelatina obtida de diversas fontes tem sido extensivamente estudada para o desenvolvimento de filmes.

A gelatina é uma proteína natural obtida a partir da hidrólise de colágeno, sendo encontrada principalmente em certas partes de animais vertebrados e invertebrados, como ossos, peles, tecidos conjuntivos e tendões. O seu uso em embalagens alimentícias baseia-se em algumas propriedades particulares, como capacidade de formação de filme, disponibilidade a baixo custo, aceitabilidade sensorial, bons atributos ópticos (transparência), propriedades mecânicas moderadas (boa alongação) e efeito de barreira contra o fluxo de gás. Em particular, resíduos gelatinosos de materiais encapsulantes podem ser revalorizados como uma fonte potencial para o desenvolvimento de materiais biodegradáveis.

Apesar de algumas características vantajosas, a aplicação industrial dos filmes biodegradáveis ainda é limitada. Em comparação aos polímeros sintéticos, os filmes à base de gelatina (e outras proteínas) geralmente apresentam menor resistência mecânica, além de serem muito sensíveis à umidade, o que afeta suas propriedades de barreira e limita suas propriedades funcionais para aplicações específicas. Portanto, a fim de modificar as características das proteínas e, conseqüentemente, melhorar as propriedades dos filmes resultantes, várias estratégias têm sido empregadas. Nesse contexto, o uso de tratamentos físicos, que incluem a



aplicação de tecnologias emergentes como o aquecimento ôhmico, o ultrassom e a radiação ultravioleta, tem demonstrado resultados promissores.

O aquecimento ôhmico é definido como um processo no qual corrente elétrica alternada é aplicada através de um material, com o objetivo principal de aquecê-lo. Além dos efeitos térmicos, essa tecnologia apresenta efeitos não-térmicos associados à passagem de eletricidade. Estudos indicam que seus efeitos não-térmicos podem alterar a maneira como o biopolímero interage com outros compostos na solução filmogênica, modificando as propriedades funcionais dos filmes. O ultrassom pode induzir modificações químicas, mecânicas e físicas nos materiais devido, principalmente, à formação e colapso de bolhas cavitacionais. A absorção de radiação ultravioleta por ligações duplas e anéis aromáticos, por sua vez, pode gerar radicais livres, aumentando as interações intermoleculares entre cadeias proteicas.

Outra técnica empregada para superar algumas das limitações dos biopolímeros é o uso de nanomateriais, que podem reforçá-los pela formação de nanocompósitos. Esses materiais são capazes de modificar as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes devido, principalmente, a modificações na cristalinidade do biopolímero. Nesse sentido, a incorporação de nanofibras de celulose bacteriana tem demonstrado potencial para aprimoramento das propriedades de filmes à base de gelatina. A celulose bacteriana é um biopolímero de escala nanométrica, produzido por uma variedade de bactérias durante a fermentação, podendo ser utilizada em substituição à celulose vegetal.

Nesse contexto, no presente trabalho serão desenvolvidos filmes biodegradáveis a partir de resíduos de cápsulas nutracêuticas gelatinosas. Diferentes estratégias serão utilizadas para modificar as propriedades e estrutura dos filmes desenvolvidos, incluindo a aplicação de tecnologias emergentes e a incorporação de nanofibras de celulose bacteriana obtidas a partir do resíduo da Kombucha. Os filmes serão caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas, de barreira, mecânicas, ópticas, estruturais, morfológicas, térmicas e de biodegradabilidade, visando avaliar e comparar os efeitos das diferentes técnicas aplicadas.

Esta dissertação está estruturada em capítulos; o **Capítulo 2** descreve os objetivos do presente trabalho. O **Capítulo 3** apresenta a fundamentação teórica e a revisão bibliográfica a respeito de embalagens convencionais e biodegradáveis, filmes de gelatina, produção e propriedades dos filmes, além de aspectos referentes às diferentes técnicas aplicadas. No **Capítulo 4** estão descritos os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento e caracterização dos filmes à base de gelatina. No **Capítulo 5** são apresentados os resultados, na forma de dois artigos científicos. O **Capítulo 6** aborda uma discussão geral e as conclusões do trabalho. Por fim, as perspectivas para trabalhos futuros são apresentadas no **Capítulo 7**.

## Capítulo 2 - Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar os efeitos de diferentes tecnologias emergentes (aquecimento ôhmico, ultrassom e radiação ultravioleta) e da incorporação de nanofibras de celulose bacteriana nas propriedades e estrutura de filmes biodegradáveis à base de gelatina.

### 2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho são:

- produzir filmes biodegradáveis a partir de resíduos gelatinosos de cápsulas nutracêuticas, através do processo de *casting*;
- avaliar a influência da intensidade de campo elétrico e do tempo de exposição nas propriedades e estrutura dos filmes produzidos, utilizando a tecnologia de aquecimento ôhmico;
- avaliar a influência da intensidade de ultrassom e do tempo de exposição nas propriedades e estrutura dos filmes produzidos, utilizando a tecnologia de ultrassom;
- investigar o efeito da aplicação da tecnologia de radiação ultravioleta nas propriedades e estrutura dos filmes;
- investigar os efeitos da incorporação de nanofibras de celulose bacteriana obtidas a partir do resíduo da Kombucha nas propriedades e estrutura dos filmes;
- caracterizar os filmes quanto às propriedades físico-químicas, de barreira, mecânicas, ópticas, estruturais, morfológicas, térmicas e de biodegradabilidade;
- comparar os filmes produzidos pelas diferentes técnicas quanto às propriedades caracterizadas.

## Capítulo 3 - Fundamentação teórica e revisão bibliográfica

Este capítulo apresenta a fundamentação teórica sobre embalagens alimentícias, polímeros e filmes biodegradáveis, com foco principal em filmes à base de gelatina. Além disso, são apresentadas as principais propriedades, métodos de caracterização e processo de produção dos filmes. São ainda apresentados aspectos referentes às diferentes estratégias empregadas para aprimoramento das propriedades dos filmes à base de gelatina, ou seja, mecanismos de ação e principais efeitos do aquecimento ôhmico, ultrassom, radiação ultravioleta e da incorporação de nanofibras de celulose bacteriana às soluções filmogênicas.

### 3.1 Embalagens alimentícias

As embalagens atendem a diversos setores, principalmente ao setor alimentício, de higiene e limpeza, cosméticos, farmacêutico e industrial. Na indústria de alimentos, além de fornecerem informações importantes, facilitarem o armazenamento e servirem como estratégia de marketing, as embalagens possuem grande importância na proteção de alimentos e matérias-primas (SUDERMAN; ISA; SARBON, 2018). Seu objetivo principal é desempenhar uma barreira física (à umidade, ao oxigênio, à temperatura, à radiação UV e à ação de microrganismos) entre os alimentos e o ambiente externo, garantindo, desta forma, qualidade sanitária e a prolongação da vida útil de itens perecíveis, especialmente os suscetíveis a agentes oxidativos e microbiológicos (OTTONI *et al.*, 2018).

Para uma embalagem ser eficiente na manutenção da integridade dos alimentos, os materiais de sua composição devem ser adequados (SIRACUSA *et al.*, 2008). Os materiais mais comuns usados para a produção das embalagens alimentícias são papel, plástico, vidro, aço e alumínio. Dentre esses materiais, os plásticos derivados de polímeros sintéticos oferecem várias vantagens sobre os demais, como baixo custo, facilidade de processamento, boa barreira ao oxigênio, capacidade de vedação térmica, qualidades estéticas e bom desempenho mecânico, com elevada resistência à tração (KIRWAN; PLANT; STRAWBRIDGE, 2011).

Os plásticos comumente utilizados para embalagens incluem tereftalato de polietileno (PET), cloreto de polivinila (PVC), polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS) e poliamida (PA). Esses materiais são derivados do petróleo, possuem natureza não-renovável e não-biodegradável, sendo utilizados de diversas formas, tais como filmes, folhas, copos, garrafas, entre outros. O seu uso em larga escala causa um significativo número de emissões de

CO<sub>2</sub> durante seu processo de extração e refinamento, gerando, assim, impacto ambiental através do aumento do efeito estufa (KAUR; YADAV, 2019).

De acordo com Geyer, Jambeck e Law (2017), cerca de 381 milhões de toneladas de plásticos foram produzidas mundialmente no ano de 2015, o que equivale a 52,2 kg por pessoa por ano. Todo o plástico produzido atendeu a diferentes setores econômicos, sendo a maior porcentagem (38,32%) destinada a embalagens de produtos. Em seguida, vêm os materiais de construção, como canos, coberturas e outros componentes, como o PVC. O terceiro maior uso é do setor têxtil, que utiliza fibras sintéticas em vestimentas, bolsas, lonas e outros acessórios.

Muitos polímeros sintéticos são produzidos e utilizados porque são resistentes à degradação química e física. Por outro lado, polímeros resistentes à degradação apresentam problemas de descarte quando sua utilidade cessa. Além de questões ambientais e de segurança, a reciclagem de plásticos é complicada por razões técnicas e econômicas. Os mecanismos detalhados de como alguns plásticos degradam após o descarte em ambientes específicos não são completamente compreendidos e têm sido objeto de intensa pesquisa durante as últimas décadas (KYRIKOU; BRIASSOULIS, 2007). Dessa forma, sua natureza não-biodegradável contribui para que esses materiais se acumulem, gerando grande volume de resíduos.

De acordo com dados publicados pelo fundo mundial para a natureza (WWF, 2019), o Brasil é o quarto maior produtor mundial de resíduos plásticos, atrás apenas dos Estados Unidos, China e Índia, gerando cerca de 11 milhões de toneladas de resíduos por ano. Além disso, o país é também um dos que menos recicla, apenas 1,2% de todo material produzido é reciclado. A maior parte dos descartes diários dos resíduos domiciliares está composta de embalagens. Mesmo que os resíduos domésticos correspondam a uma pequena parte do total, estes são os que mais geram impactos ao meio ambiente (FARRIS *et al.*, 2009).

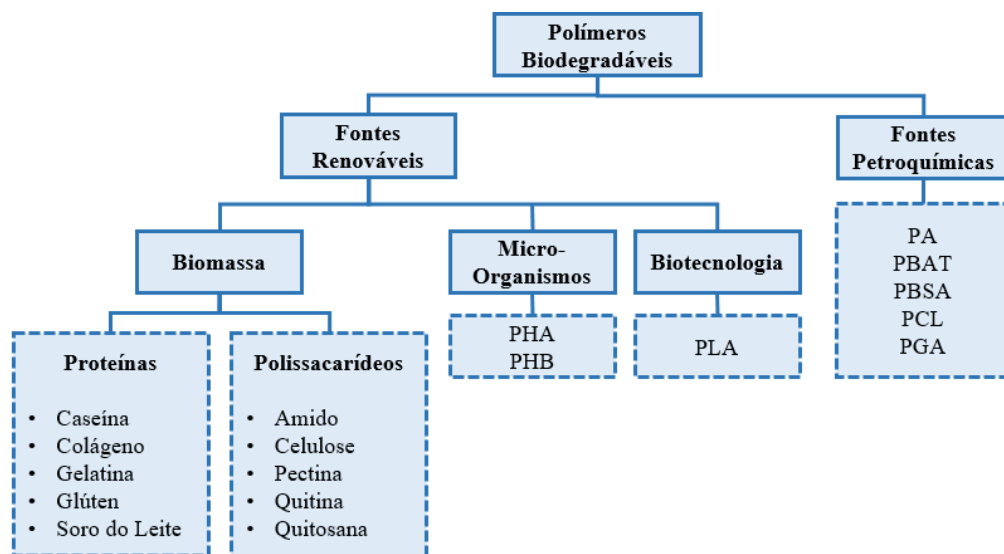
Os problemas ambientais ocasionados pelo uso crescente de plásticos sintéticos, a preocupação com sua natureza não-renovável e não-biodegradável e as explosões nos preços dos derivados de petróleo, têm incentivado vários grupos de pesquisa e empresas a desenvolverem alternativas mais ecológicas, como é o caso das embalagens e filmes formados a partir de biopolímeros. Esses materiais podem substituir, parcial ou completamente, as embalagens convencionais. De fato, o cenário atual torna lucrativo concentrar as pesquisas em biomateriais renováveis, abordando o desenvolvimento de novas técnicas e métodos que aproveitam as características únicas e individuais dos biopolímeros prontamente disponíveis (FARRIS *et al.*, 2009).

### 3.2 Polímeros biodegradáveis

Os biopolímeros podem ser utilizados para substituir plásticos não biodegradáveis com o intuito de reduzir o impacto ambiental e a dependência de materiais de origem fóssil. De acordo com o European Bioplastics (2016), o conceito de biopolímero abrange materiais de base biológica (*biobased*) e biodegradável. Materiais de base biológica são materiais derivados de biomassa (de origem vegetal), como milho, cana-de-açúcar ou celulose. Já materiais biodegradáveis são os materiais que passam pelo processo biológico de conversão da matéria orgânica em materiais naturais, como dióxido de carbono, metano e água. Esse processo ocorre através da ação de microrganismos prontamente disponíveis no ambiente, sem adição de aditivos artificiais.

A biodegradabilidade não depende da origem das matérias-primas, depende apenas da composição química dos polímeros, e, portanto, polímeros biodegradáveis podem ser elaborados a partir de matérias-primas renováveis ou petroquímicas (ROBERTSON, 2008). Dessa forma, podem ser classificados em diferentes tipos de acordo com seus processos e fontes de síntese, como mostrado na Figura 1 (ZHONG *et al.*, 2020). A classificação geral envolve a divisão em polímeros de fontes renováveis e não-renováveis (fontes petroquímicas). Os polímeros de fontes renováveis são ainda divididos em três diferentes grupos: obtidos diretamente da biomassa (proteínas e polissacarídeos), obtidos por fermentação microbiana (poli-hidroxialcanoatos - PHA e Poli-3-hidroxi-butirato - PHB) ou sintetizados da biomassa, a partir de biotecnologia (ácido polilático - PLA).

**Figura 1** - Classificação dos polímeros biodegradáveis.



Fonte: Adaptado de ZHONG *et al.*, 2020.

Os fatores ambientais que afetam a taxa de biodegradação incluem temperatura, nível de umidade, pressão atmosférica, pressão de oxigênio, concentrações de ácidos e metais e grau de exposição à luz. Os fatores relacionados aos microrganismos incluem sua concentração, presença ou não de enzimas, concentração de enzimas e presença de inibidores ou predadores. Se algum dos requeridos elementos está ausente, ou se está presente em um nível abaixo de um limiar crítico, a biodegradação pode desacelerar ou parar completamente, até que as condições adequadas sejam novamente atingidas (BILLINGHAM; BONORA; DE CORTE, 2003). A degradação dos polímeros também depende do ambiente em que os plásticos são expostos durante sua vida útil e o ambiente em que os resíduos de polímero são descartados após o uso.

Em relação à sua aplicação, os polímeros biodegradáveis não estão significativamente presentes no mercado, mas deverão ser mais expressivos futuramente, uma vez que estes polímeros geram resíduos de curta duração, além do aumento de pesquisas referentes à sua aplicação tecnológica (ROCHA, 2009). Nas últimas décadas, os biopolímeros têm atraído interesse principalmente devido às demandas por alguns campos médicos, bem como apoio às políticas governamentais (WANG; WENG, 2016). Atualmente, o PLA (ácido polilático) é o biopolímero de maior expressão comercial, pois apresenta propriedades mecânicas e térmicas semelhantes às dos polímeros sintéticos à base de petróleo (GÜRLER; PAŞA; TEMEL, 2021). Setores onde a aplicação de biopolímeros é promissora incluem: indústria farmacêutica, setor de embalagens, agricultura e indústria automotiva. Muitos materiais que foram desenvolvidos e comercializados são aplicados em mais de uma dessas categorias; entretanto, os biopolímeros que podem ser empregados para a produção de filmes e embalagens continuam recebendo mais atenção do que os designados para qualquer outra aplicação (ASHWIN; KARTHICK; ARUMUGAM, 2011).

### **3.3 Filmes biodegradáveis**

Filmes e revestimentos biodegradáveis consistem em uma camada fina de biopolímero revestida sobre um alimento ou colocada como barreira entre o alimento e o ambiente circundante. A principal diferença entre esses sistemas é que o filme é uma camada fina formada separadamente e então aplicada; enquanto que os revestimentos são formados diretamente sobre os produtos alimentícios (ZINK *et al.*, 2016). São classificados em comestíveis e/ou biodegradáveis, dependendo dos constituintes utilizados para sua produção e, também, da quantidade das substâncias empregadas (BERTAN, 2008). A principal função desses filmes é

manter a qualidade (sabor, cor e valor nutricional) e a segurança dos produtos alimentícios durante o armazenamento e transporte, além de ampliar sua vida útil (ROONEY, 2005).

Os filmes biodegradáveis advindos da biomassa são compostos principalmente por um agente formador de filme (macromolécula), responsável por sintetizar uma estrutura coesiva, e um solvente, geralmente água ou etanol. Além disso, aditivos como plastificantes (glicerol e sorbitol), agentes ajustadores de pH (ácido acético e  $\text{NH}_4\text{OH}$ ), antimicrobianos, antioxidantes ou emulsificantes são geralmente necessários para melhorar as propriedades e a estrutura dos filmes (BERTAN, 2008). De acordo com a macromolécula utilizada, os filmes biodegradáveis são divididos em três categorias: filmes polissacarídeos, proteicos ou lipídicos. Amidos, alginatos, pectinas, carragenas, ágar e derivados de celulose são os polissacarídeos mais utilizados; as proteínas mais utilizadas incluem glúten, proteína isolada de soja, gelatina e albumina de ovo; já a categoria de lipídeos inclui as ceras e ácidos graxos (VIÉGAS, 2016). Filmes compósitos também podem ser elaborados a partir da mistura de dois ou mais componentes formadores de filme.

Dentre os biopolímeros, as proteínas oferecem as melhores perspectivas para a produção de filmes e embalagens alimentícias. As proteínas são heteropolímeros cujas unidades monoméricas são os aminoácidos. As combinações dos 20 aminoácidos dos quais as proteínas são compostas fornecem um número quase ilimitado de diferentes cadeias poliméricas, com diversas propriedades físico-químicas. Além disso, as proteínas contêm uma grande variedade de grupos funcionais que tornam possível alterá-las enzimática, química ou fisicamente, variando as propriedades dos materiais obtidos, para ajustá-las às necessidades específicas de cada aplicação (GÓMEZ-ESTACA *et al.*, 2016).

Filmes feitos a partir de proteínas possuem uma série de propriedades que podem ser de grande interesse para embalagem de alimentos, como boas propriedades ópticas (brilho e transparência), excelentes propriedades de barreira ao oxigênio, umidade baixa e propriedades mecânicas moderadas, em comparação aos filmes sintéticos. Uma das principais limitações das proteínas como materiais de embalagem é a sua alta sensibilidade à água, o que está associado à natureza inerentemente hidrofílica dessas macromoléculas, resultando em uma fraca barreira ao vapor d'água (HERNÁNDEZ-MUÑOZ *et al.*, 2005). Dentre os polímeros proteicos, a gelatina tem sido amplamente utilizada no desenvolvimento de filmes biodegradáveis devido à sua alta biocompatibilidade e bioatividade, associadas a sequências peptídicas específicas (ETXABIDE *et al.*, 2017).

### 3.3.1 Filmes biodegradáveis à base de gelatina

A gelatina é uma proteína obtida pela hidrólise do colágeno contido nos ossos, cartilagens e na pele (SHANKAR; JAISWAL; RHIM, 2016). Fonte, idade animal, tipo do colágeno e métodos de fabricação são fatores intrínsecos que afetam o seu desempenho físico e suas propriedades químicas. Embora, até o momento, já tenham sido identificados 27 tipos diferentes de colágeno, o colágeno tipo I ocorre mais amplamente no tecido conjuntivo. As moléculas intersticiais de colágeno são compostas por três  $\alpha$ -cadeias entrelaçadas na chamada hélice tripla de colágeno. Essa estrutura específica, estabilizada principalmente por ligações de hidrogênio intra e intermolecular, é o produto de uma repetição quase contínua da sequência Gly-X-Y-, onde X é principalmente prolina e Y é principalmente hidroxiprolina (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011).

O colágeno nativo insolúvel deve ser pré-tratado (química e termicamente) antes de ser convertido em uma forma adequada para extração. O pré-tratamento químico quebra as ligações não covalentes, de modo a desorganizar a estrutura da proteína, produzindo entumescimento e solubilização do colágeno. O tratamento térmico subsequente cliva as ligações de hidrogênio e ligações covalentes para desestabilizar a hélice tripla, resultando na conversão do colágeno em gelatina solúvel (DJABOUROV; LECHAIRE; GAILL, 1993). Basicamente, existem dois tipos de gelatina: gelatina tipo A e gelatina tipo B, as quais se diferem quanto ao tipo de preparação. A gelatina tipo A recebe pré-tratamento ácido antes da desnaturação térmica, obtendo um ponto isoelétrico na faixa de pH entre 7 e 9; a gelatina tipo B, por sua vez, recebe pré-tratamento alcalino, com ponto isoelétrico em pHs entre 4,6 a 5,2 (GENNADIOS *et al.*, 1994).

A fonte mais abundante de gelatina é a pele de mamíferos, especialmente bovinos e suínos; no entanto, gelatinas de origem marinha estão crescendo cada vez mais como fonte alternativa (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2002). Em relação à sua aplicação, a gelatina vem sendo utilizada há anos e hoje é um dos mais versáteis ingredientes para a manufatura comercial de alimentos; é o gelificante mais conhecido e tem um vasto uso na indústria alimentícia, farmacêutica e fotográfica. Na indústria alimentícia, a gelatina é utilizada para texturizar os alimentos, resultando em diversas texturas dependendo da concentração aplicada. Atua também como um excelente agente estabilizante, que ajuda a manter as características físicas de diversos alimentos, fornecendo viscosidade e espessura (LEINER, 2013).

A gelatina também possui excelentes propriedades de formação de espuma, além de ter o ponto de fusão próximo ao da temperatura corporal, fazendo com que se torne uma matéria-prima interessante para a preparação de filmes comestíveis (CHEN *et al.*, 2019). Suas propriedades físicas e estruturais são principalmente influenciadas pela distribuição da massa



molar e composição de aminoácidos, que desempenham um papel vital nas propriedades reológicas e de barreira dos filmes resultantes. A capacidade de formação de filme pode ser influenciada pela composição, distribuição e polaridade de aminoácidos, ligações iônicas cruzadas entre grupos amino e carboxil, ligação de hidrogênio e ligações dissulfeto intra e intermoleculares (DANGARAN; TOMASULA; QI, 2009).

No geral, filmes à base de gelatina são transparentes, impermeáveis ao oxigênio e são reversíveis. Apresentam biodegradabilidade, biocompatibilidade, propriedades gelificantes e plasticidade. Além disso, podem possuir propriedades antioxidantes e antimicrobianas, se forem adicionados alguns agentes, como óleos essenciais cítricos (CHEN *et al.*, 2019). Entretanto, uma das principais desvantagens dos filmes de gelatina é a alta sensibilidade à água, que faz com que o filme se desintegre ou que suas propriedades mecânicas e de barreira sejam prejudicadas. Dessa forma, diferentes estratégias têm sido desenvolvidas para melhorar as propriedades desses filmes, dentre elas: *cross-linking* (reticulação), aplicação de tratamento físicos (ultrassom, aquecimento ôhmico, radiação UV, micro-ondas), desenvolvimento de filmes laminados e compósitos com nanomateriais (MARTUCCI; RUSECKAITE, 2009).

A literatura científica sobre fontes alternativas e novas funcionalidades de colágeno e gelatina vêm crescendo muito nos últimos anos, em parte, devido ao crescente interesse na valorização econômica de subprodutos industriais, gerenciamento *eco-friendly* de resíduos e a busca de condições de processamento inovadoras (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011). Nesse contexto, filmes de gelatina podem ser obtidos principalmente a partir de resíduos e subprodutos originados do abate de animais, do processamento de peixes e de fontes farmacêuticas. Na indústria de carne, a maioria dos resíduos é produzida durante o abate e inclui ossos, tendões, pele, conteúdo do trato gastrointestinal, sangue e órgãos internos do animal abatido, que não podem ser vendidos como carne ou utilizados em produtos à base de carne (FLÔRES *et al.*, 2017).

Em relação ao campo farmacêutico, a gelatina tem sido amplamente utilizada para a fabricação de cápsulas macias e duras, expansores de plasma e em materiais para cuidados com feridas. O processamento de cápsulas gelatinosas macias implica na formação de partes remanescentes de material, semelhantes a uma rede, que pode então ser coletada para recuperação e reciclagem da gelatina (IAHNKE, 2019). Assim, os resíduos provenientes da gelatina, usados principalmente como materiais encapsulantes para fornecer compostos alimentares bioativos com princípios ativos, podem ser revalorizados como uma fonte potencial para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis, compostos principalmente por gelatina, glicerol e água (RAMOS *et al.*, 2016).

### 3.4 Propriedades e caracterização de filmes biodegradáveis

A principal função da embalagem de alimentos é proteger o produto alimentício do ambiente circundante e manter a qualidade dos alimentos embalados ao longo de sua vida útil. Para materiais de embalagem que entram em contato direto e/ou interagem com os alimentos, requisitos adicionais precisam ser atendidos, incluindo estabilidade bioquímica, físico-química e microbiana, ausência de substâncias tóxicas, boas propriedades de barreira, eficiência mecânica e segurança do filme (WIHODO; MORARU, 2013). Outras características importantes e que influenciam diretamente na aceitação de filmes pelos consumidores diz respeito à aparência e propriedades sensoriais, incluindo cor, opacidade, textura e espessura (ZACTITI, 2004).

Os métodos utilizados para a determinação das propriedades dos filmes e recobrimentos comestíveis/biodegradáveis são derivados dos métodos clássicos aplicados aos materiais sintéticos. Entretanto, estes métodos foram adaptados às características dos biopolímeros devido, principalmente, à grande sensibilidade à umidade relativa e à temperatura (VICENTINI, 2003). A seguir, serão descritas as principais propriedades de filmes biodegradáveis e seus respectivos métodos de avaliação.

#### 3.4.1 Propriedades físico-químicas

As propriedades físico-químicas são fundamentais para se avaliar a funcionalidade dos filmes e as possíveis aplicações como embalagens alimentícias. As principais propriedades físico-químicas envolvidas na caracterização de filmes biodegradáveis são: espessura, umidade e solubilidade em água. De acordo com Jiang *et al.* (2010), as propriedades físico-químicas de filmes compósitos dependem da natureza das matérias-primas e de outros fatores de processamento, como concentração, proporção da mistura, pH, temperatura, força iônica, entre outros.

A espessura dos filmes é definida como a distância perpendicular entre duas superfícies principais, sendo uma propriedade importante para se avaliar a uniformidade do material. Conhecendo-se a espessura, é possível obter informações sobre a resistência mecânica e as propriedades de barreira aos gases e ao vapor d'água (HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008). A espessura pode ser medida com um medidor digital ou por microscopia eletrônica de varredura, sendo o primeiro método mais simples e rápido. Uma ampla gama de valores de espessura foi relatada para filmes de biopolímeros compostos na literatura, indicando sua

dependência com a composição do filme e com os parâmetros de processamento (GARCÍA *et al.*, 2009a).

O conteúdo de umidade é um parâmetro relacionado com o volume total ocupado por moléculas de água na rede microestrutural do filme; a solubilidade, por sua vez, está relacionada com a aptidão que o material tem de se dissolver na água. A solubilidade é muito influenciada pelo tipo e concentração do polímero, dos aditivos e dos plastificantes adicionados à formulação. É uma propriedade de extrema importância pois a afinidade do filme com a água pode ser desejável ou não. Em casos de encapsulamento ou revestimento de alimentos, aditivos ou medicamentos, o filme deve apresentar afinidade com a água. Já no caso de embalagens em que se objetiva a proteção e integridade do produto contra a água, deseja-se um filme insolúvel (CARISSIMI, 2017).

### **3.4.2 Propriedades de barreira**

Filmes de biopolímero devem ter propriedades de transferência de massa adequadas para seu uso. Perdas significativas de qualidade podem ocorrer devido à transferência de umidade, gases, aroma, sabor ou cor do alimento para o ambiente circundante. Por exemplo, as perdas de umidade em frutas e vegetais durante o armazenamento a longo prazo podem resultar em subsequente perda de peso e encolhimento (WIHODO; MORARU, 2013). Nesse contexto, a principal propriedade de barreira de filmes biodegradáveis é a permeabilidade ao vapor d'água. A permeabilidade é uma propriedade de estado estacionário que descreve a taxa na qual uma substância permeadora se difunde através de um filme, com uma força motriz relacionada à diferença na concentração dessa substância entre os dois lados do material (SOUZA *et al.*, 2009).

Uma das formas de se avaliar a taxa de permeabilidade ao vapor d'água de filmes e embalagens flexíveis é através de método gravimétrico, o qual se baseia no aumento de massa de um material higroscópico colocado no interior de uma cápsula impermeável e isolado do meio ambiente pelo material de embalagem, cuja taxa de permeabilidade se deseja conhecer. A cápsula é colocada em um ambiente com umidade relativa e temperatura constantes e o ganho de massa da cápsula ao longo do tempo é usado para calcular a taxa de permeabilidade do vapor d'água através do material. Esse tipo de ensaio aplica-se a materiais de embalagem que vão acondicionar produtos com baixa atividade de água (SARANTÓPOULOS *et al.*, 2017).

O sucesso dos filmes de biopolímero em atender às necessidades de barreira de um produto alimentício é fortemente influenciado pelos componentes do filme, especialmente os plastificantes, que modificam a estrutura do filme, a mobilidade da cadeia e os coeficientes de

difusão dos permeantes (GARCÍA *et al.*, 2009a). Densidade do polímero, coeficiente de solubilidade do polímero com a água, morfologia, concentração das macromoléculas, área e espessura do filme, tempo de permeação e temperatura também são fatores importantes que afetam à barreira a gases e umidade (DIAS, 2008).

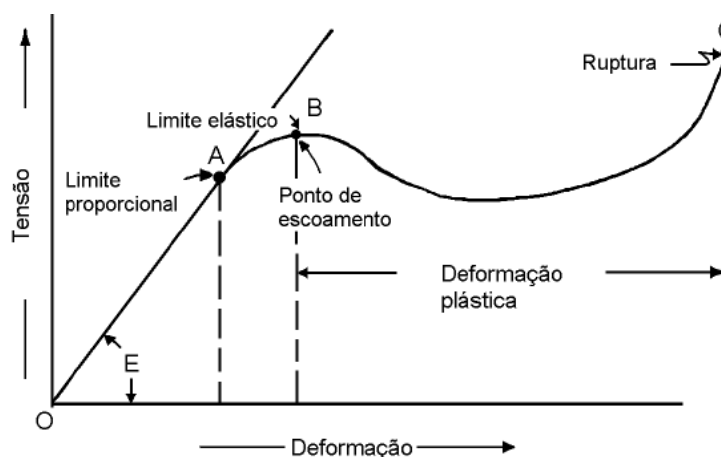
Comparado às ceras comestíveis e à maioria dos polímeros sintéticos, os filmes de proteínas têm altos valores de permeabilidade ao vapor d'água, decorrente do caráter hidrofílico dessas macromoléculas. Entre as diferentes proteínas, a menor permeabilidade corresponde aos filmes de proteínas miofibrilares de zeína de milho, glúten de trigo e peixe (KROCHTA, 2002). A estrutura das cadeias poliméricas e a distribuição de lipídeos dentro da matriz desempenham um papel significativo na permeabilidade dos filmes. Como os lipídeos possuem uma excelente barreira à umidade, a incorporação de lipídeos em filmes proteicos pode ser uma estratégia para reduzir o valor dessa propriedade (LACROIX, 2009).

### **3.4.3 Propriedades mecânicas**

As propriedades mecânicas dos filmes dependem da natureza do material filmogênico e de sua coesão estrutural, a qual está relacionada com a aptidão do polímero em formar ligações a nível molecular, dificultando sua separação quando submetida a forças mecânicas. Esta aptidão depende da extensão da cadeia polimérica, da sua geometria, da sua massa molar e da natureza e posição de grupamentos laterais (VICENTINI, 2003). No geral, filmes e revestimentos empregados como embalagem de alimentos devem ser resistentes à ruptura, para que possam reforçar a estrutura do alimento e facilitar o seu manejo. Além disso, devem ser flexíveis, para que possam se adaptar às possíveis deformações sem se romper (ROCHA, 2009).

As propriedades mecânicas dos filmes podem ser determinadas por meio de um texturômetro, em testes de tração, obtendo-se a curva de tensão-deformação (ZACTITI, 2004). Um exemplo de curva característica é apresentado na Figura 2. Verifica-se que, inicialmente, o material oferece resistência crescente à solicitação de tração, a qual provoca seu alongamento. A partir de certo ponto (A), o aumento da resistência passa a ser menor para um mesmo aumento de deformação até o ponto de escoamento (B), a partir do qual é possível alongar o filme sem que este responda com um aumento de resistência. Continuando o alongamento, o material resiste até que ocorra sua ruptura (C) (ROCHA, 2009).

**Figura 2** - Curva característica da resistência à tração versus deformação.



Fonte: VICENTINI, 2003.

A resistência à tração, a alongação e o módulo de Young são as principais propriedades mecânicas caracterizadas em filmes. A resistência à tração é a resistência máxima oferecida pelo material quando submetido à tração, sendo a tensão máxima verificada na curva característica. Essa propriedade pode fornecer a magnitude das forças intermoleculares envolvidas na matriz polimérica. A alongação (expressa em %), ou também chamada de deformação na tração, é a relação entre o alongamento do corpo de prova e seu comprimento inicial, podendo ser determinada para a situação de ruptura. O módulo de elasticidade, ou módulo de Young, é a razão entre a tensão e a deformação dentro do limite elástico, em que a deformação é totalmente reversível e proporcional à tração. O módulo de elasticidade representa a rigidez do material (SARANTÓPOULOS *et al.*, 2017).

Aditivos, como plastificantes, lipídeos ou materiais de reticulação, podem modificar as propriedades mecânicas dos filmes devido às mudanças físicas induzidas na estrutura da rede, resultantes de alterações físico-químicas nas interações polímero-polímero (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2001). As mudanças induzidas dependem do tamanho molecular, da polaridade, forma e da afinidade do aditivo com as moléculas do polímero. Geralmente, a incorporação de maiores quantidades de agentes de reticulação melhora a resistência à tração dos filmes de biopolímero e reduz seu alongamento na ruptura (GARAVAND *et al.*, 2017).

#### 3.4.4 Propriedades ópticas

A cor e a transparência são as propriedades ópticas mais importantes para caracterização dos filmes biodegradáveis. A cor está relacionada com a matéria-prima utilizada na elaboração dos mesmos. Como exemplo, os filmes de glúten de trigo geralmente apresentam coloração

amarelada, ao contrário dos filmes à base de gelatina que são praticamente incolores (VICENTINI, 2003). A transparência ou opacidade, por sua vez, relaciona-se com a quantidade de luz incidente no produto. Para uma boa apresentação visual do produto, é desejável que as embalagens plásticas apresentem alta transparência. Por outro lado, muitas vezes a proteção contra a incidência de luz se faz necessária, para evitar a degradação de componentes fotossensíveis, como por exemplo vitaminas B12 e C (OLIVEIRA *et al.*, 1996).

A cor de um material pode ser determinada através de cartas ou atlas de cores, sendo o Livro de Cor da Munsell (*Munsell Book of Color*) um dos mais conhecidos. Pode-se também fazer uso de colorímetros, os quais se baseiam nas escalas de cor CIELab ou HunterLab. Na escala de cor CIELab é necessária a determinação dos parâmetros de cor:  $L^*$ , que mede a luminosidade de materiais variando de 0 (preto) a 100 (branco),  $a^*$ , que varia do verde (-) ao vermelho (+), e  $b^*$ , que varia do azul (-) ao amarelo (+). Com os valores obtidos, é possível calcular a diferença de cor do filme em comparação com um padrão ou com uma placa branca. Tanto as cartas de cor quanto os colorímetros descrevem os três atributos da cor: tom, croma e valor (VICENTINI, 2003).

A transparência ou opacidade de um material é geralmente calculada por método espectrofotométrico. Esses parâmetros são avaliados através da transmitância interna, ou seja, sobre o mínimo de absorção ou reflexão da incidência de luz que atravessa o material. Quanto maior for o valor de transmitância, maior é a transparência do filme e, assim, maior será a influência da luz sobre a oxidação e degradação do alimento revestido (CARISSIMI, 2017). Nesse contexto, ingredientes que absorvam a luz no espectro UV-visível, como os antioxidantes, podem ser incorporados para elaboração de filmes opacos, que apresentam maior resistência às reações de degradação (SILVA-WEISS *et al.*, 2013).

### **3.4.5 Propriedades estruturais e morfológicas**

As características microestruturais são altamente influenciadas pela formulação do filme e pelo processo de fabricação e estão intimamente relacionadas com as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes de biopolímeros (HERNANDEZ-IZQUIERDO; KROCHTA, 2008). As propriedades estruturais também dependem de vários fatores, tais como: a razão entre as zonas cristalina e amorfa, a mobilidade da cadeia polimérica e as interações específicas entre grupos funcionais de polímeros e a substância permeante nas zonas amorfas. As técnicas comumente utilizadas para elucidar a estrutura do filme incluem microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios-X (DRX) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (GARCÍA *et al.*, 2009a).

O MEV pode ser usado para avaliar a homogeneidade do filme, estrutura da camada, poros e trincas, suavidade e espessura da superfície. As imagens têm alta profundidade de foco, o que permite a obtenção de diferentes relevos da superfície; são imagens tridimensionais e, portanto, mais fáceis de interpretar do que as imagens de projeção da microscopia de transmissão (CANEVAROLO JR, 2003). Através da observação da microestrutura por MEV, Ogale *et al.* (2000) mostraram que os sulcos e vales vistos na seção transversal dos filmes de proteína isolada de soja podem estar relacionados a um material mais dúctil. Por outro lado, microestruturas lisas indicaram um material mais vítreo e quebradiço.

O FTIR é uma técnica útil para complementar a caracterização microestrutural de filmes compostos, uma vez que pode ser utilizada para avaliar as interações entre os componentes do filme. Os padrões de DRX, por sua vez, são utilizados para investigar as zonas amorfas e cristalinas do material (GARCÍA *et al.*, 2009a). Em geral, a cristalinidade dos filmes compósitos depende das seguintes condições de processamento: fonte do biopolímero, plastificante, integridade da dissolução do biopolímero em água, condições de secagem do filme (taxa e temperatura) e teor final de umidade das amostras (VAN SOEST; VLIEGENTHART, 1997).

#### **3.4.6 Propriedades térmicas**

A análise termogravimétrica (TGA) é uma das técnicas mais empregadas para avaliar a estabilidade térmica de filmes de biopolímeros. Na análise de TGA, monitora-se a perda de massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo, em um ambiente de temperatura e atmosfera controladas. As curvas de TGA podem ainda ser derivadas obtendo-se a DTG (termogravimetria derivada), que fornece informações da derivada primeira da variação da massa em relação ao tempo ( $dm/dt$ ) ou em função da temperatura ( $dm/dT$ ). De acordo com Bach & Chen (2017), a utilização do analisador termogravimétrico apresenta vantagens de fácil operação, quantidade mínima de matéria-prima e controle preciso do registro de temperatura e perda de massa da amostra.

Para prever o desempenho de filmes à base de proteínas em diferentes condições finais de uso, que variam do congelamento ao cozimento, as transições térmicas dos filmes também precisam ser investigadas. A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é a técnica amplamente utilizada para caracterizar as transições térmicas de um polímero. As transições térmicas de proteínas detectadas pelo DSC incluem as temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ), fusão, cristalização, desnaturação térmica, agregação e degradação de proteínas (HERNANDEZ-IZQUIERDO; KROCHTA, 2008).

### 3.4.7 Biodegradabilidade

Estrutura, morfologia, massa molar, tratamentos químicos e radiação são alguns dos fatores que afetam a taxa de degradação dos polímeros. Geralmente, os polímeros sintéticos apresentam grandes grupos em sua estrutura, o que faz com que os grupos hidrolisáveis fiquem inacessíveis às enzimas. Dessa forma, os polímeros sintéticos precisam passar previamente por um processo de degradação (pela ação de O<sub>2</sub>, luz ou calor), para que estejam disponíveis para a ação dos microrganismos (BONA, 2007). Por outro lado, polímeros biodegradáveis passam pelo processo de degradação que resulta em fragmentos de menor massa molar, produzidos pela ação de microrganismos que ocorrem naturalmente no solo, como bactérias, fungos e algas. Sob condições apropriadas de umidade, temperatura e disponibilidade de O<sub>2</sub>, a biodegradação é um processo rápido (ROBERTSON, 2012).

A biodegradação completa de um material é comumente medida através de testes descritos na ASTM D5338-15 (2015), que é equivalente à ISO 14852. Nesse método, a biodegradação de materiais poliméricos é determinada sob condições controladas de compostagem. Este é o método de teste padrão mais amplamente utilizado para a determinação da taxa e do grau de biodegradação de materiais de embalagem, sob condições que simulam um processo intensivo de compostagem aeróbica. Entretanto, além de passar nos métodos de teste, para uma embalagem ser certificada como “compostável”, deve atender a vários outros requisitos, como o teste de desintegração, ter metais pesados abaixo de certos limites e passar no teste de ecotoxicidade (ROBERTSON, 2012).

Vários pesquisadores já estudaram a biodegradabilidade de filmes. Maran *et al.* (2014) avaliaram a degradação de filmes compósitos à base de amido de mandioca, através de experimentos de compostagem. A partir dos resultados, foi observado que o aumento da absorção de água promove a entrada de microrganismos do solo, que utilizam os filmes de amido como fonte de energia para o seu crescimento. O processo de biodegradação de filmes à base de gelatina foram investigados por Martucci & Ruseckaite (2010). Os resultados mostraram que a gelatina é uma proteína suscetível à ação de enzimas presentes em vários microrganismos. Além disso, os filmes à base de gelatina foram avaliados como materiais que se biodegradam rapidamente em ambientes naturais.

### 3.5 Produção de filmes biodegradáveis por *casting*

Existem dois métodos principais para produzir filmes a partir de proteínas: processamento a úmido (*casting*) e processamento a seco (extrusão, termoformagem), sendo



que cada método induz diferentes modificações na rede do biopolímero, que afetam a estrutura da matriz final do filme (GÓMEZ-ESTACA *et al.*, 2016). Em alguns casos, os filmes de biopolímeros não podem ser extrusados da mesma forma que os polímeros sintéticos, pois não possuem pontos de fusão definidos e sofrem decomposição após o aquecimento. Dessa forma, o método de *casting* é geralmente o mais utilizado na produção de filmes biodegradáveis à base de proteínas (THARANATHAN, 2003).

O método de *casting* consiste em dissolver o biopolímero em solventes adequados (geralmente água ou etanol) para formar a solução filmogênica, à qual são adicionados os aditivos ou compostos funcionais (plastificantes, reticulantes, antimicrobianos, micro/nanopartículas). A solução é então espalhada em um material de base adequado, seguido por um processo de secagem, em condições ambientes ou sob umidade relativa controlada (GÓMEZ-ESTACA *et al.*, 2016). Conforme investigado por Perez-Gago & Krochta (2000), o método de secagem pode afetar significativamente as propriedades físicas do filme, incluindo aparência, morfologia, propriedades mecânicas e de barreira. O tipo de solvente ou pH de dissolução também podem afetar a conformação das proteínas (CHEN *et al.*, 2019).

Vários tipos de equipamentos estão disponíveis para o espalhamento da solução, desde placas de fundição simples até equipamentos mais avançados, como revestidores contínuos ou em batelada. Os equipamentos mais sofisticados podem produzir filmes maiores, espalhando mecanicamente a solução em uma espessura fixa. Por ser eficaz e econômico, o método mais comumente utilizado para formar filme de biopolímero em escala laboratorial é o espalhamento manual das soluções de filme em placas de Petri de acrílico ou teflon (DANGARAN; TOMASULA; QI, 2009). A escolha do material de base é importante para a obtenção de filmes, que podem ser facilmente removidos sem rasgar ou enrugar. Geralmente, um teor de umidade entre 5 e 8% é desejável no filme, para facilitar sua remoção do material de base (THARANATHAN, 2003).

A principal vantagem do método de *casting* é atribuída ao processo exclusivo de secagem de um líquido em uma superfície, sem aplicação de estresse mecânico ou térmico. Além disso, este método oferece uma variedade de características específicas para o produto final, como distribuição homogênea da espessura, maior pureza óptica, livre de géis ou manchas, excelente transparência, orientação isotrópica, baixo retardo óptico e excelente planicidade (SIEMANN, 2005). O uso de temperaturas baixas durante o processamento também é vantajoso, visto que a maioria dos biopolímeros sofrem mudanças estruturais irreversíveis quando submetido a altas temperaturas (SUHAG *et al.*, 2020). Comparativamente,

filmes produzidos por *casting* apresentam maior resistência à tração e menor espessura, enquanto que filmes preparados por extrusão apresentam maior alongação (CHEN *et al.*, 2019).

### **3.6 Tecnologias emergentes para aplicação em filmes**

Filmes e revestimentos usados como materiais de embalagem devem ser adequados para garantir a qualidade e segurança do alimento. Portanto, além da biodegradabilidade, a funcionalidade do material à base de biopolímeros também é importante. Embora os filmes de biopolímero ofereçam muito potencial como barreiras de transferência de massa para melhorar a qualidade dos alimentos, as aplicações industriais têm sido limitadas (WU *et al.*, 2002). Em comparação com os polímeros sintéticos, os filmes de biopolímero (obtidos diretamente da biomassa) geralmente apresentam baixa resistência mecânica, baixa resistência a gases e líquidos, além de dificuldades no aumento de escala (JEEVAHAN *et al.*, 2020).

A estrutura química complexa e a estrutura das cadeias laterais fornecem oportunidades para melhorar materiais baseados em biopolímeros, através de vários meios físicos e químicos, incluindo mudanças de pH, desnaturação por calor, mudanças de solvente, mistura, reticulação, composição com fibras naturais e novas metodologias de processamento (MARTUCCI; RUSECKAITE, 2009). Em particular, o uso de tecnologias emergentes como aquecimento ôhmico, ultrassom e radiação ultravioleta, tem sido uma alternativa promissora para melhorar as propriedades e a estrutura de filmes e revestimentos biodegradáveis.

As tecnologias emergentes são processos em fase de pesquisa e desenvolvimento, que apresentam potencial significativo para serem comercializados, mas que até o momento representam apenas uma pequena porcentagem do mercado. As equipes de pesquisa da indústria e da academia têm dedicado ampla atenção ao desenvolvimento desses processos, tentando compreender os seus efeitos em diferentes materiais alimentares (LEE, 2015).

#### **3.6.1 Aquecimento ôhmico**

Os tratamentos térmicos tradicionais são a base da indústria de alimentos, fornecendo perfis de segurança necessários e extensão da vida útil dos produtos alimentícios (CULLEN; TIWARI; VALDRAMIDIS, 2012). Esses processos usam essencialmente a transferência de calor por condução, convecção e radiação de uma superfície quente para um material. A resistência interna à transferência de calor do material é frequentemente o fator limitante desses processos, o que pode resultar em um tratamento heterogêneo (GOULLIEUX; PAIN, 2014). Além disso, para garantir que a temperatura desejada seja atingida no ponto crítico, podem

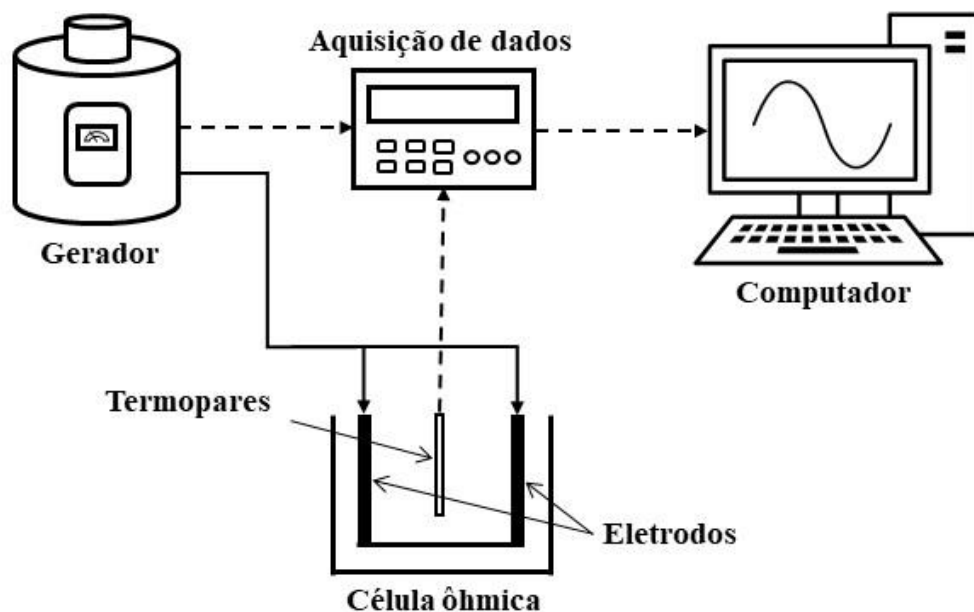
ocorrer zonas de sobreaquecimento, afetando as características nutricionais e sensoriais dos alimentos. Nesse contexto, novas metodologias de processamento, como o aquecimento ôhmico, possuem grande potencial como tecnologia alternativa de aquecimento.

O aquecimento ôhmico (também chamado de aquecimento Joule) é baseado na passagem de corrente elétrica alternada através de um material, que oferece resistência à passagem desta corrente. O aquecimento se deve à conversão da energia elétrica em térmica, ocorrendo de forma homogênea e instantânea. A magnitude de aquecimento depende da intensidade da corrente elétrica que é passada através do material (SOUZA *et al.*, 2010). Esta metodologia difere de outras tecnologias de aquecimento elétrico (ex. micro-ondas, aquecimento indutivo) devido a três principais fatores: contato dos eletrodos com o material a ser aquecido, frequência aplicada e formato da onda elétrica (SASTRY; BARACH, 2000).

É possível aplicar aquecimento ôhmico na maioria dos alimentos, pois eles contêm espécies iônicas, como sais e ácidos, que atuam como eletrólitos, conduzindo a corrente elétrica e gerando calor. Em um sistema de aquecimento convencional, a condutividade térmica do alimento controla sua taxa de aquecimento, enquanto que em um processo ôhmico, a condutividade elétrica é o fator dominante (HALDEN; DE ALWIS; FRYER, 1990). As frequências comumente empregadas para aquecimento ôhmico de alimentos são 50 e 60 Hz (VARGHESE *et al.*, 2014). Segundo Sastry & Barach (2000), o aquecimento ôhmico possui, além do efeito térmico, um efeito não térmico que ocorre devido ao acúmulo de cargas nas paredes celulares, formando poros (eletroporação).

As possibilidades de projeto de um sistema de aquecimento ôhmico são infinitas, mas existem alguns elementos que sempre estarão presentes, como uma fonte de alimentação (gerador), uma câmara de armazenamento (ou célula ôhmica) e eletrodos em contato físico com o alimento. O monitoramento da temperatura também pode ser realizado através de termopares e sistemas de aquisição de dados (Figura 3). Em algumas configurações, a distância entre os eletrodos pode ser variada, alterando-se, conseqüentemente, a intensidade do campo elétrico ( $V\text{ cm}^{-1}$ ) (VARGHESE *et al.*, 2014).

**Figura 3** - Esquema representativo de um sistema de aquecimento ôhmico.



Fonte: Adaptado de KOUBAA *et al.*, 2018.

No aquecimento ôhmico, como em todas as técnicas de aquecimento volumétrico, a ausência de superfícies quentes em contato com o produto leva a uma redução da degradação térmica e, portanto, obtém-se um produto de melhor qualidade, com melhor textura, coloração e sabor. Dessa forma, o aquecimento ôhmico é uma alternativa em áreas onde os trocadores de calor tradicionais podem causar problemas, como incrustações, redução da qualidade do produto por superaquecimento ou onde os produtos são difíceis de aquecer, devido a um grande teor de sólidos (MALONEY; HARRISON, 2016). Além disso, as vantagens também incluem menor tempo de cozimento e maior eficiência energética, sendo também um processo favorável ao meio ambiente (VARGHESE *et al.*, 2014).

Devido a seus inúmeros benefícios, o aquecimento ôhmico é utilizado em muitas aplicações, como branqueamento, evaporação, desidratação, fermentação, extração, esterilização e pasteurização (KOUBAA *et al.*, 2018). Recentemente, essa tecnologia vem sendo aplicada no processo de produção de filmes, como alternativa aos processos convencionais de aquecimento. Alguns estudos indicam melhoria significativa nas propriedades e estrutura dos filmes, devido principalmente aos efeitos não-térmicos, associados à eletricidade. Estima-se que a presença de um campo elétrico externo pode causar distúrbios na estrutura dos biopolímeros, promovendo modificação e/ou aumento de ligações intermoleculares.

### 3.6.1.1 Efeito do aquecimento ôhmico nas propriedades de filmes

Até o presente momento, há poucos trabalhos referentes à aplicação de aquecimento ôhmico na produção de filmes biodegradáveis; entretanto, as pesquisas existentes mostram que há melhora significativa nas propriedades dos filmes desenvolvidos. Lei *et al.* (2007) investigaram o efeito do aquecimento ôhmico e do aquecimento convencional (banho-maria) na produção de filmes proteico-lipídicos à base de leite de soja. Os resultados indicaram vantagens no uso de aquecimento ôhmico, incluindo a melhoria do rendimento, da taxa de formação e da capacidade de reidratação dos filmes.

García *et al.* (2009b) analisaram o efeito da aplicação de campo elétrico na microestrutura e propriedades de filmes formulados com diferentes concentrações de quitosana e metilcelulose. O filme controle apresentou superfície mais homogênea do que os filmes tratados, que apresentaram superfície mais rugosa. Porém, o tratamento com campo elétrico resultou em uma estrutura com camadas mais regulares e ordenada, apresentando maior índice de cristalinidade. Os filmes tratados com campo elétrico também apresentaram menor permeabilidade ao vapor d'água, ou seja, melhor propriedade de barreira.

O efeito da intensidade do campo elétrico nas propriedades de filmes de quitosana foi avaliado por Souza *et al.* (2009), sendo testadas quatro diferentes intensidades (50, 100, 150 e 200 V cm<sup>-1</sup>). O resultado mais pronunciado foi observado nos tratamentos com intensidade superior a 100 V cm<sup>-1</sup>. A solubilidade em água e as permeabilidades ao vapor d'água, oxigênio e dióxido de carbono diminuíram significativamente com a aplicação do aquecimento ôhmico. Verificou-se também que os filmes tratados eletricamente possuem uma estrutura muito mais uniforme, com menor rugosidade.

Pereira *et al.* (2010) analisaram os efeitos do aquecimento ôhmico na estrutura física e propriedades dos filmes comestíveis de proteínas de soro de leite e compararam com o aquecimento convencional. Os resultados mostraram que o aquecimento ôhmico gerou menor agregação e menor concentração de sulfidrila livres nas soluções de formação de filme. Os filmes tratados também apresentaram menor permeabilidade ao vapor d'água e um aumento na hidrofobicidade da superfície. O tipo de tratamento térmico não teve efeito significativo na solubilidade dos filmes, no teor de umidade e nos valores de resistência à tração.

Resultados promissores da aplicação de aquecimento ôhmico (9,5 V cm<sup>-1</sup> e 19 V cm<sup>-1</sup>) em filmes comestíveis à base de resíduos de cápsulas de gelatina foram obtidos por Iahnke *et al.* (2019). Os filmes produzidos pela aplicação de campo elétrico apresentaram melhores propriedades mecânicas (resistência à tração e módulo de Young) e térmicas, além de aumento

da cristalinidade, em comparação aos filmes produzidos por aquecimento convencional. A espessura, morfologia e as propriedades relacionadas à água não foram afetadas.

Até o momento, o trabalho mais recente referente à aplicação de aquecimento ôhmico na produção de filmes foi publicado por Tinoco *et al.* (2020). O objetivo foi avaliar as propriedades de filmes de queratina preparados por aquecimento ôhmico e convencional, sob condições de perfis térmicos similares. Obteve-se um pequeno aumento na concentração de tióis livres e uma diminuição considerável da solubilidade das soluções de queratina submetidas a aquecimento ôhmico. Os resultados indicaram que o aquecimento ôhmico mostra potencial para adaptar as propriedades dos filmes de queratina, dependendo da aplicação ou funcionalidade pretendida.

### 3.6.2 Ultrassom

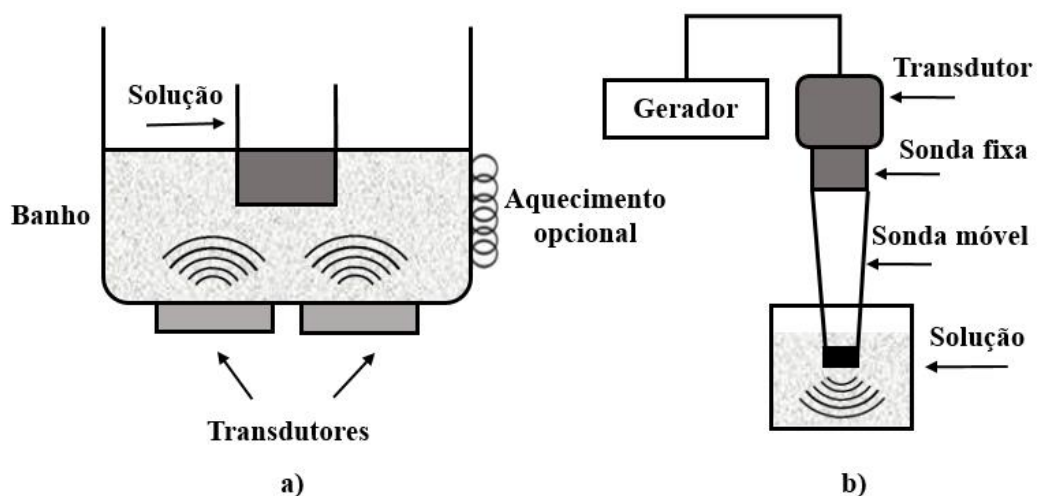
Ondas sonoras são vibrações mecânicas que viajam através de materiais sólidos na forma de ondas transversais e através de líquidos e gases na forma de ondas longitudinais. O ultrassom, por sua vez, refere-se a ondas sonoras com frequência maior que a faixa audível para os seres humanos. A frequência ultrassônica mais baixa é geralmente definida em 20 kHz, e o limite superior é geralmente 5 MHz para gases e 500 MHz para líquidos e sólidos (LEADLEY; WILLIAMS, 2006). O ultrassom faz uso de fenômenos físicos e químicos que são fundamentalmente diferentes em comparação com aqueles aplicados nas técnicas convencionais de extração, processamento ou preservação (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011). Essa tecnologia de processamento emergente tem sido cada vez mais utilizada em síntese química, preparação de produtos farmacêuticos e processamento de alimentos (GÜLSEREN *et al.*, 2007).

O ultrassom pode ser classificado em duas categorias: ultrassom de baixa intensidade (alta frequência) e ultrassom de alta intensidade (baixa frequência). O ultrassom de baixa intensidade usa níveis de potência inferiores a  $1 \text{ W cm}^{-2}$ , com uma faixa de frequência de 2-20 MHz. O ultrassom de alta intensidade usa níveis de potência muito mais altos, normalmente na faixa de  $10\text{-}1000 \text{ W cm}^{-2}$ , com a faixa de frequência de 20-100 kHz (LEADLEY; WILLIAMS, 2006). O ultrassom de baixa intensidade é usado em imagens médicas (por exemplo, varredura fetal), análises químicas, avaliação da qualidade dos alimentos (maturação, composição) e testes não destrutivos (FENG; YANG, 2006). Este tipo de ultrassom não causa alterações físicas ou químicas nas propriedades dos materiais (TIWARI; MASON, 2012).

O ultrassom de alta intensidade, por sua vez, é capaz de alterar as propriedades dos materiais, causando distúrbios físicos e/ou aceleração de certas reações químicas. Os efeitos térmicos, mecânicos e químicos são atribuídos à rápida formação e colapso de bolhas cavitacionais, gerando tensões normais e de cisalhamento. Essas forças de cisalhamento e as entradas de energia são fortes o suficiente para romper ligações intermoleculares (LEADLEY; WILLIAMS, 2006). Além disso, as bolhas produzem fluxo altamente turbulento com pressões e temperaturas extremas, sendo já calculadas temperaturas pontuais de até 5000 K e pressões de até 1200 bar (GÜLSEREN *et al.*, 2007). Dessa forma, o ultrassom de alta intensidade é utilizado em muitas aplicações alimentares, como emulsificação, esterilização, extração, degaseificação, filtração e secagem (JAMBRAK *et al.*, 2009).

Os sistemas de ultrassom são constituídos de transdutores ultrassônicos, dispositivos que convertem energia elétrica em energia mecânica (som), podendo ser aplicados de duas formas: banho ou sonda (MASON, 1998). O banho ultrassônico (Figura 4a) é comumente utilizado para dispersão sólida em solvente e para soluções de degaseificação; tem a vantagem de ser um aparelho barato e facilmente adaptável, mas a intensidade fornecida é baixa e altamente atenuada pela água contida no banho. Por outro lado, a sonda (Figura 4b) é muito mais poderosa, visto que a intensidade ultrassônica é fornecida por uma pequena superfície (ponta da sonda) imersa diretamente no frasco de reação. Esse sistema é amplamente utilizado para sonicação de pequenos volumes de amostra (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011).

**Figura 4** - Esquema representativo: banho (a) e sonda ultrassônica (b).



Fonte: Adaptado de SÃO JOSÉ *et al.*, 2014.

Comparado a outras tecnologias, o ultrassom oferece vantagem em termos de produtividade, rendimento e seletividade, menor tempo de processamento, maior homogeneidade e menores riscos químicos. Devido aos efeitos físicos envolvidos, o ultrassom também pode ser usado de forma eficaz para reduzir a viscosidade de sistemas alimentares, por meio do rompimento de agregados e da redução da interação entre estruturas vizinhas (ASHOKKUMAR *et al.*, 2010). Efeitos promissores do uso do ultrassom sozinho ou em combinação com outras técnicas (que envolvem calor ou pressão) já são demonstrados em escala laboratorial (O'DONNELL *et al.*, 2010). Recentemente, essa tecnologia ganhou uma nova aplicação referente ao desenvolvimento de filmes biodegradáveis.

### ***3.6.2.1 Efeito do ultrassom nas propriedades de filmes***

A tecnologia de ultrassom vem sendo utilizada em filmes à base de diferentes matérias-primas, como estratégia para melhorar suas propriedades. Marcuzzo *et al.* (2010) investigaram o efeito do tratamento por ultrassom nas propriedades de filmes à base de glúten. Os resultados mostraram que o ultrassom tornou a superfície dos filmes mais uniforme e regular em comparação com os filmes não tratados. O ultrassom também melhorou a dispersão de proteínas e a aparência final do filme, além de promover propriedades hidrofílicas em sua superfície. De forma geral, o tratamento se mostrou útil para dissolver agregados de proteínas preparados em condições ácidas.

Kadam *et al.* (2013) avaliaram o efeito do ultrassom em filmes de proteína isolada do soro do leite reforçados com sílica porosa. Os resultados mostraram aumento significativo na resistência, elasticidade e hidrofobicidade. Por outro lado, a permeabilidade ao vapor d'água foi ligeiramente influenciada pelas condições de tratamento. Esses efeitos foram atribuídos à distribuição homogênea do filme promovida pela sonicação. Resultados semelhantes foram encontrados por Cruz-Diaz *et al.* (2019), na aplicação de ultrassom de alta intensidade em filmes comestíveis de concentrado de proteína de soro de leite.

Zhong *et al.* (2015) estudaram os efeitos do tratamento com ultrassom nas propriedades de filmes compósitos de metilcelulose e ácido esteárico, submetidos a diferentes condições de tempo (0-30 min) e potência (0-270 W). A exposição ao ultrassom teve efeitos positivos na resistência à tração e alongação dos filmes. O ultrassom também afetou as propriedades de barreira à umidade e da superfície hidrofóbica. Os valores ótimos de resistência à tração e alongação foram obtidos pela amostra tratada por 10 min e 180 W, enquanto a amostra tratada por 10 min e 270 W apresentou o menor valor de permeabilidade ao vapor d'água.



Borah *et al.* (2017) avaliaram o efeito do tratamento ultrassônico (45 e 60 min) no desenvolvimento de filmes compósitos à base de casca de batata e bagaço de limão doce. Observou-se que o ultrassom aumentou a resistência do filme, a capacidade de alongamento e o processo de desaglomeração das partículas. Além disso, os filmes se tornaram mais transparentes e apresentaram estrutura mais homogênea e ordenada. Por outro lado, Kang & Min (2010) observaram que os biofilmes de casca de batata formados a partir de solução tratada com ultrassom continham uma superfície mais grossa e uma estrutura mais fraca, em comparação aos filmes formados por homogeneização à alta pressão e irradiação.

O efeito do tratamento por ultrassom nas propriedades de filmes de nanoemulsão obtidos a partir da proteína do farelo de aveia e óleo essencial de cravo foram observados por Gul *et al.* (2018). As soluções foram submetidas a diferentes tempos (2, 4 e 6 min) e amplitudes (50, 75 e 100%). Os resultados mostraram que a espessura e a solubilidade em água dos filmes diminuíram significativamente com a intensificação do tratamento. Verificou-se, também, o aumento da resistência à tração e da alongação. O tratamento com amplitude de 100% por 6 min promoveu filmes com superfície mais regular, com distribuição homogênea de lipídeos e sem trincas e poros, o que contribuiu para as boas propriedades de barreira desse filme.

Mais recentemente, Vera, Tapia e Abugoch (2020) avaliaram o efeito do ultrassom de alta intensidade (US) em combinação com transglutaminase (TG) e nanopartículas nas propriedades de filmes compósitos de quinoa e quitosana. Estruturalmente, observou-se que as temperaturas máximas da degradação térmica aumentaram, gerando filmes com maior estabilidade térmica. O tratamento com ultrassom também melhorou a resistência à tração (com ou sem aplicação de TG), enquanto a combinação US-TG produziu uma diminuição significativa na alongação. No entanto, a permeabilidade ao vapor d'água aumentou com a aplicação do ultrassom, piorando as propriedades de barreira.

### **3.6.3 Radiação ultravioleta**

A radiação UV é a radiação eletromagnética com comprimentos de onda que variam de 100 a 400 nm, correspondente à porção do espectro que se estende da extremidade violeta da faixa de luz visível até a região dos raios X. De acordo com o comprimento de onda, a radiação UV pode ser dividida em três tipos principais: UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) e UVC (100-290 nm) (COBB *et al.*, 2019). O comprimento de onda afeta diretamente a capacidade da onda capaz de penetrar em um material e quão prejudicial é para o mesmo. Enquanto o UVC é mais prejudicial que o UVA e UVB a materiais orgânicos, devido à sua maior energia, seu

menor comprimento de onda faz com que seja mais facilmente disperso e absorvido. Como resultado, o UVC é completamente bloqueado pela atmosfera da Terra e não é uma preocupação significativa para a maioria das aplicações terrestres (NIKAFSHAR *et al.*, 2017).

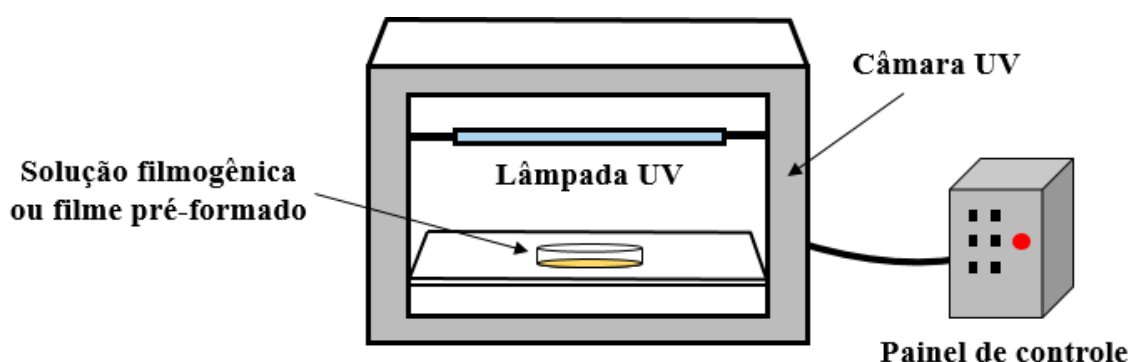
A radiação UV como tecnologia física, econômica, não térmica e ecológica tem recebido atenção crescente nos últimos anos, durante os quais foi aplicada com sucesso na preservação e descontaminação de produtos alimentícios (WANG; MAJZOBI; FARAHNAKY, 2020). A exposição à luz UV pode gerar radicais livres, que podem decompor moléculas orgânicas e, portanto, matar bactérias e outros microrganismos. Este efeito também se baseia em revestimentos autolimpantes, pois uma vez que os contaminantes orgânicos sejam decompostos, torna-se mais fácil remover as substâncias inorgânicas (KIRBY, 2012). A luz UV deve fornecer inativação eficaz de vírus, bactérias vegetativas, esporos bacterianos, leveduras, conídios e parasitas. A descoberta da inativação UV dos parasitas resistentes ao cloro catalisou o uso da luz UV na indústria de água (GÓMEZ-LÓPEZ; KOUTCHMA; LINDEN, 2012).

À medida que a luz UV se propaga, ela interage com os materiais por meio de absorção, reflexão, refração e espalhamento (GÓMEZ-LÓPEZ; KOUTCHMA; LINDEN, 2012). A energia capturada é convertida em energia química, induzindo a fotoisomerização. Consequentemente, a exposição de ligações duplas de proteínas e anéis aromáticos à radiação UV leva à formação de radicais livres em aminoácidos, como tirosina e fenilalanina, que podem, então, formar ligações covalentes intermoleculares (FATHI; ALMASI; PIROUZIFARD, 2018). Algumas aplicações envolvem o uso de UV para reticular proteínas com ácidos nucleicos (GENNADIOS *et al.*, 1998), para modificar a solução de colágeno (MENTER *et al.*, 2001) e para melhorar as propriedades de géis de gelatina de peixe (BHAT; KARIM, 2009). Em alguns casos, a geração dos radicais livres pode afetar adversamente os alimentos. Os possíveis efeitos incluem danos às vitaminas e proteínas, destruição dos antioxidantes, oxidação dos lipídeos, mudanças na cor, sabores e aromas indesejáveis (GÓMEZ-LÓPEZ; KOUTCHMA; LINDEN, 2012).

Assim como a irradiação gama (radiação ionizante), o UV também tem sido usado para melhorar as propriedades de filmes à base de proteínas. No entanto, a radiação ionizante pode comprometer as características dos filmes devido à sua alta energia (OTONI *et al.*, 2012). A energia da radiação UV é substancialmente mais fraca do que a energia da radiação ionizante, portanto, é improvável que o tratamento UV comprometa o uso potencial de filmes à base de proteínas como filmes comestíveis (GENNADIOS *et al.*, 1998). A eficácia da radiação UV em filmes de biopolímero depende de diferentes variáveis, como estado físico, espessura e composição do material. A turbidez e as propriedades da superfície também podem afetar a

energia absorvida e a transmitância de luz. Portanto, as modificações nas propriedades dos filmes podem ser diferentes se o tratamento UV for aplicado na solução filmogênica ou no filme pré-formado (FATHI; ALMASI; PIROUZIFARD, 2018). A Figura 5 mostra um exemplo de sistema de radiação UV para aplicações em filmes, que consiste basicamente de uma fonte de alimentação, uma câmara e lâmpadas UV.

**Figura 5** - Esquema representativo de aplicação de radiação UV.



### 3.6.3.1 Efeito da radiação ultravioleta nas propriedades de filmes

Gennadios *et al.* (1998) avaliaram o efeito da radiação UV nas propriedades de filmes à base de proteína isolada de soja. Os resultados mostraram que a resistência à tração aumentou, enquanto o alongamento na ruptura diminuiu linearmente com a dosagem da radiação. Esses efeitos foram atribuídos à formação de uma estrutura de filme mais densa e compacta e, portanto, com matrizes de proteína mais fortes, porém, menos elásticas. Verificou-se também a intensificação da coloração amarelada dos filmes. Resultados similares foram obtidos por Rhim *et al.* (2000), na avaliação do mesmo tipo de filme.

Liu, Tellez-Garay e Castell-Perez (2004) modificaram as propriedades de filmes de proteína de amendoim usando radiação UV por até 24 h. O tratamento UV foi aplicado diretamente nos filmes e não na solução filmogênica. A resistência à tração dos filmes tratados com UV aumentou de 0,55 MPa (controle) para 1,01 MPa, para o tratamento de alta dose (24 h). O tratamento UV não afetou significativamente a permeabilidade ao vapor d'água e a coloração dos filmes. Por outro lado, a permeabilidade ao oxigênio e a solubilidade diminuíram significativamente com aumento do tempo de exposição.

Ustunol & Mert (2004) estudaram o efeito da radiação UV aplicada em soluções formadoras de filme à base de proteína do soro do leite. Os resultados mostraram um aumento significativo da resistência à tração. Porém, o tratamento UV não afetou a alongação, a

solubilidade e as permeabilidades ao vapor d'água e ao oxigênio. Resultados semelhantes foram relatados por Schmid *et al.* (2015), que irradiou filmes pré-formados de proteína de soro de leite. Verificou-se que a resistência à tração aumentou significativamente com o tempo de exposição, enquanto que a elongação e o módulo de Young não foram afetados.

Otoni *et al.* (2012) avaliaram os efeitos da radiação UV-B nas propriedades de filmes à base de dois tipos de gelatina: gelatina de peixes de água fria e gelatina de tilápia de água quente. Os índices de refração indicaram reticulação de cadeias da gelatina após exposição à radiação. Ambas amostras de gelatina tratadas com UV-B exibiram maior resistência e viscosidade do que as amostras não tratadas. Os filmes de gelatina de tilápia apresentaram maiores valores de resistência à tração e elongação do que os filmes de gelatina de peixes de água fria.

Díaz, Candia e Cobos (2016) estudaram os efeitos da radiação UV aplicada em diferentes doses (0,12 - 12,0 J cm<sup>-2</sup>) nas propriedades de filmes de concentrado de proteína de soro de leite, tratados antes ou após a formação do filme. Os filmes tratados apresentaram aumento significativo na resistência à tração e diminuição na solubilidade. A radiação UV também fez com que os filmes fossem mais amarelos, mais verdes e mais escuros do que os filmes não tratados. Além disso, os filmes tratados apresentaram uma superfície mais regular, com numerosos furos pequenos, independentemente da dose aplicada. A permeabilidade ao vapor d'água e o teor de matéria seca não foram afetados.

Mais recentemente, Fathi, Almasi e Pirouzifard (2018) avaliaram o efeito da radiação UV em filmes comestíveis à base de proteína de gergelim. Diferentes tipos de luz UV (UV-A, UV-B e UV-C) foram aplicados à solução de formação de filme e aos filmes pré-formados. Com o tratamento UV, verificou-se aumento no índice de cristalinidade e o desenvolvimento de uma estrutura mais compacta, sem furos e trincas. O teor de umidade, solubilidade e permeabilidade foram diminuídos e as propriedades mecânicas foram aprimoradas. No geral, a aplicação do UV na solução foi mais eficaz do que nos filmes pré-formados. Dentre os tipos de radiação, a luz UV-C apresentou os resultados mais promissores para o aprimoramento das propriedades dos filmes.

### **3.7 Filmes nanocompósitos**

A formação de nanocompósitos é outra estratégia que vem sendo empregada para modificação das propriedades dos filmes de biopolímeros. Os nanocompósitos são formados por uma matriz contínua (normalmente polimérica) reforçada por um ou mais materiais que

apresentem pelo menos uma dimensão característica menor do que 100 nm (HU; ONYEBUEKE; ABATAN, 2010). A resistência dos filmes compósitos depende das propriedades da matriz, das características do agente de reforço e da compatibilidade entre a matriz e o agente de reforço. Espera-se que os materiais de embalagem nanocompósitos forneçam boas propriedades de barreira, alta resistência mecânica, estabilidade térmica, estabilidade química, biodegradabilidade, estabilidade dimensional, resistência ao calor e transparência (STARK, 2016).

Os materiais de reforço são geralmente adicionados à matriz polimérica em quantidades muito pequenas (< 5% em massa), podendo ser de natureza orgânica ou inorgânica. Os materiais inorgânicos incluem o dióxido de titânio, óxido de zinco, prata, nanopartículas de ouro, nanoargila, entre outros. Materiais orgânicos incluem principalmente nanofibras de celulose, *whiskers* de quitina, nanocristal de amido e seus nanocompósitos (GHANBARZADEH; OLEYAEI; ALMASI, 2015). Dentre esses materiais, as nanofibras de celulose são muito utilizadas devido principalmente à sua natureza ambientalmente correta. Além disso, quando adicionadas em pequenas quantidades, podem fornecer melhorias nas propriedades mecânicas e de barreira, mantendo a transparência do filme. Nesse contexto, a celulose bacteriana é um interessante biomaterial atualmente em estudo por sua fina rede e biocompatibilidade, podendo ser utilizada em substituição à celulose vegetal (GEORGE; SIDDARAMAIAH, 2012).

### **3.7.1 Nanofibras de celulose bacteriana**

A celulose bacteriana (CB) é um biopolímero de escala manométrica, produzido por uma variedade de bactérias durante a fermentação (BARUD *et al.*, 2016). Assim como a celulose vegetal, a CB é um polissacarídeo linear composto por monômeros de  $\beta$ -D-glucopiranosose ligados por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas, formando moléculas de celobiose. Entretanto, diferentemente da celulose vegetal, a CB é sintetizada de forma pura, livre de restos de outras moléculas vegetais, como lignina, hemicelulose ou pectina. A pureza da CB é uma das suas principais vantagens, uma vez que não requer processos caros de extração e purificação ou o uso de produtos químicos ambientalmente perigosos (CHENG; CATCHMARK; DEMIRCI, 2009).

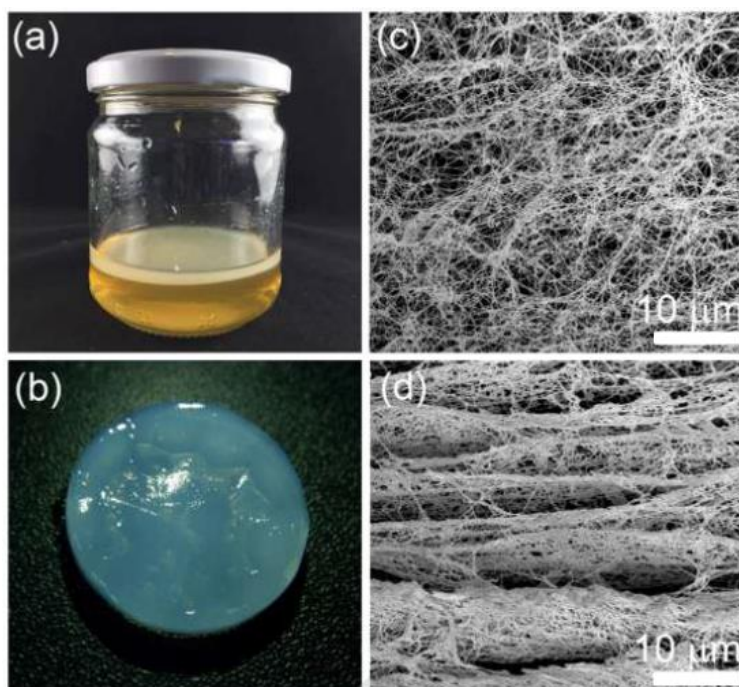
Os primeiros relatórios científicos sobre a CB foram publicados por volta de 1886, pelo químico britânico Adrian J. Brown (BROWN, 1886). Esse autor identificou a celulose como um componente da película gelatinosa formada na fermentação do vinagre por “um fermento acético, denominado de *Bacterium xylinum*”. Atualmente, a CB é bem conhecida em alguns países asiáticos como matéria-prima para alguns produtos alimentícios. Na China, a CB é

utilizada para a fermentação do chá de Kombucha, onde a CB suporta uma colônia simbiótica de bactérias e leveduras de ácido acético (SCOBY). Nas Filipinas, a CB é utilizada para preparar a famosa sobremesa chamada “Nata de Coco”, que é composta basicamente por CB fermentada em água de coco e, posteriormente, temperada (CAZÓN; VÁZQUEZ, 2021).

As principais bactérias aeróbias que sintetizam extracelularmente a CB são conhecidas como *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Dickeya* e *Rhodobacter*. Dentre essas, as mais utilizadas para a produção de celulose são *Gluconacetobacter xylinum* e *Gluconacetobacter hansenii* devido à sua capacidade de metabolizar uma ampla gama de fontes de carbono e nitrogênio (AZEREDO *et al.*, 2019). As principais hipóteses sugerem que a CB é formada como um mecanismo de autodefesa para proteger as bactérias dos efeitos prejudiciais da luz UV ou para ajudar as bactérias a flutuar na interface ar-líquido, a fim de garantir o fornecimento suficiente de oxigênio (REINIATI; HRYMAK; MARGARITIS, 2017).

A película gelatinosa de CB (Figura 6a) produzida durante a fermentação é um hidrogel (Figura 6b). Esse material pode conter até 99% em massa de líquido, havendo uma diferença de cerca de 100 vezes entre a massa dos estados úmido e seco. No hidrogel, cerca de 90% das moléculas de água estão fortemente ligadas ao grande número de grupos -OH dentro das moléculas de celulose. As bactérias podem tecer nanofibras de celulose mesmo durante a divisão celular, resultando em redes de nanofibras finamente ramificadas, como verificado na Figura 6c. Estas nanofibras formam uma estrutura de rede 3D aleatória com um tamanho inferior a 100 nm de diâmetro. Em contraste, uma vista transversal da CB apresenta multicamadas de nanofibras planas (Figura 6d) (SRIPLAI; PINITSOONTORN, 2021).

**Figura 6** - Celulose bacteriana: película gelatinosa (a), hidrogel (b), MEV da superfície plana (c) e MEV da seção transversal (d).



Fonte: SRIPLAI & PINITSOONTORN, 2021.

Além de alta pureza, a CB apresenta várias vantagens quando comparada à celulose vegetal, mesmo que ambas possuam a mesma estrutura química. A CB apresenta uma estrutura única (altamente porosa, flexível, alta capacidade de retenção de água, baixa densidade, alta cristalinidade e abundância de grupos -OH), além de apresentar uma rede 3D ultrafina de baixo peso e elevada área superficial (SRIPLAI; PINITSOONTORN, 2021). Devido à alta cristalinidade, a CB também apresenta propriedades mecânicas favoráveis, como alta resistência à tração e alto módulo de Young, sendo que este último pode alcançar valores de até 15 GPa. A elevada rigidez é principalmente atribuída à forte ligação interfibrilar na rede ultrafina (AHMED; GULTEKINOGLU; EDIRISINGHE, 2020).

Devido às suas propriedades características, a CB vem sendo utilizada em diversas aplicações, principalmente relacionadas ao campo biomédico, podendo ser utilizada em curativos de queimaduras ou na engenharia de tecidos (substituição de vasos sanguíneos e regeneração de nervos) (AHMED; GULTEKINOGLU; EDIRISINGHE, 2020). Outras aplicações incluem o uso de CB para produção de papel, em indústrias farmacêuticas, tratamento de água, membranas para filtração e na indústria alimentícia. Para aplicações em

alimentos, a CB já foi estudada como agente espessante e gelificante, estabilizador, aditivo de ligação de água e também como material de embalagem (CAZÓN; VÁZQUEZ, 2021).

Recentemente, as nanofibras de CB têm sido incorporadas em filmes à base de biopolímeros, para modificação de suas propriedades e estrutura. Propriedades aprimoradas pela incorporação de CB já foram relatadas para filmes à base de amido (CHIULAN *et al.*, 2018; FABRA *et al.*, 2016; NOSHIRVANI *et al.*, 2018), gelatina (CHANG *et al.*, 2012; HAGHIGHI *et al.*, 2021; LEITE *et al.*, 2020; NOORBAKHS-SOLTANI; ZERAFAT; SABBAGHI, 2018; TAHERI *et al.*, 2020), proteína de trigo (WANG *et al.*, 2017) e casca de batata (XIE *et al.*, 2020). Os principais resultados incluem o aprimoramento mecânico (aumento da resistência à tração e do módulo de Young), redução significativa da solubilidade em água, aumento da cristalinidade e melhoria das propriedades de barreira (redução da permeabilidade ao vapor d'água).



## Capítulo 4 - Materiais e Métodos

### 4.1 Materiais

Os filmes biodegradáveis foram desenvolvidos a partir de resíduos gelatinosos gerados no processamento de cápsulas nutracêuticas, apresentados na Figura 7. Os resíduos foram cedidos pelo Laboratório Químico Farmacêutico Tiaraju (Rio Grande do Sul, Brasil).

As nanofibras de celulose bacteriana foram elaboradas a partir de um resíduo industrial da Kombucha, denominado SCOBY (*symbiotic culture of bacteria and yeast*), fornecido pela Tao Indústria de Produtos Alimentícios (Rio Grande do Sul, Brasil). O SCOBY foi sintetizado a partir da fermentação estática, utilizando chá verde, chá preto e açúcar cristal como substratos, sendo composto principalmente por água (98%), fibras totais (1,5%) e carboidratos (0,4%).

**Figura 7** - Resíduos gelatinosos do processamento de cápsulas nutracêuticas.



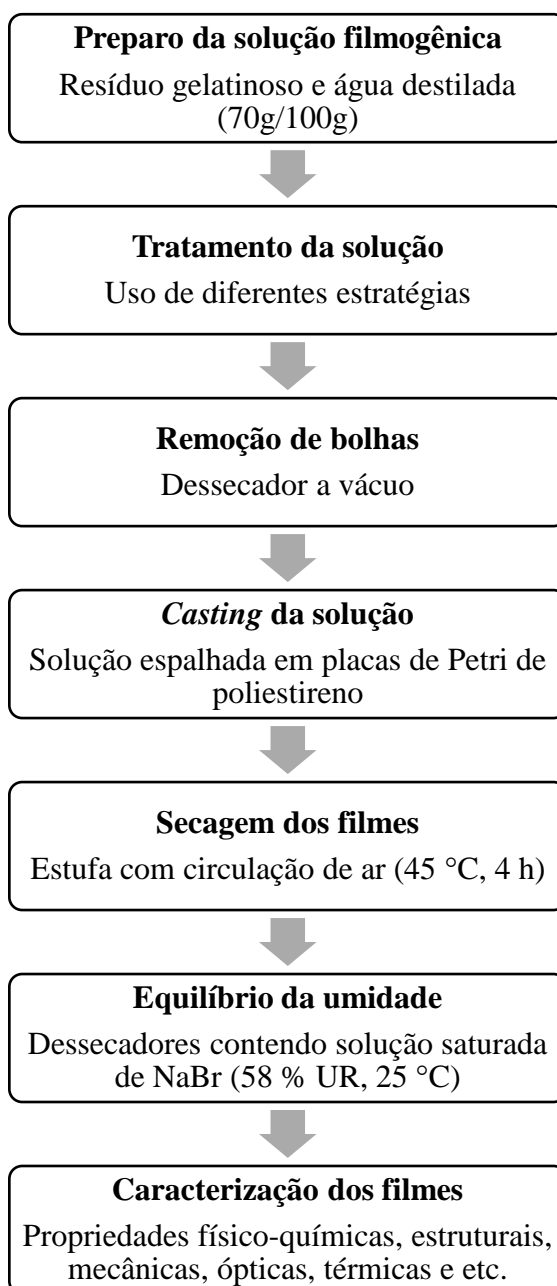
### 4.2 Caracterização dos resíduos gelatinosos

A composição centesimal dos resíduos gelatinosos foi realizada de acordo com os métodos de análise da AOAC (2005). O teor de proteínas foi determinado pelo método de Kjeldahl, utilizando fator de correção de 5,55. O conteúdo de lipídeos foi determinado utilizando um extrator de Soxhlet (modelo 2055, Fodd Soxtec, Dinamarca). O teor de cinzas foi determinado em mufla (modelo 312.6SO ML1729, Elektro Therm Linn, Alemanha), operando a 550 °C, e o teor de umidade foi determinado por método gravimétrico, pesando-se a amostra antes e após secagem em estufa (modelo TE-394/2, Tecnal, Brasil). Por fim, visto que os resíduos gelatinosos não possuem carboidratos em sua composição, utilizou-se o método da diferença para determinação do teor de glicerol.

### 4.3 Obtenção dos filmes à base de gelatina por *casting*

Experimentos preliminares foram realizados para determinar a proporção de resíduo gelatinoso e água destilada (g resíduo/100 g água) que resultaria em uma solução filmogênica homogênea. Independente da tecnologia aplicada, todos os filmes foram produzidos pelo método de *casting*, de acordo com a metodologia adaptada de Iahnke *et al.* (2019). Na Figura 8 encontra-se o diagrama da elaboração e caracterização dos filmes.

**Figura 8** - Diagrama de elaboração dos filmes à base de gelatina.



A solução filmogênica foi preparada a partir da dissolução de 70 g dos resíduos gelatinosos em 100 g de água destilada. Não foi necessária a adição de plastificante, visto que os resíduos já possuem glicerol em sua composição. A solução foi aquecida até 75 °C e mantida sob agitação magnética até completa solubilização dos resíduos e obtenção de uma solução homogênea. Em seguida, a solução foi tratada por aquecimento ôhmico, ultrassom, ou radiação ultravioleta, de acordo as metodologias que serão detalhadas nos itens **4.3.1**, **4.3.2** e **4.3.3**, respectivamente. O filme controle foi produzido por aquecimento convencional, conforme descrito no item **4.3.4**.

A remoção das bolhas ocorreu em dessecador a vácuo. Em seguida, a solução tratada foi vertida em placas de Petri de poliestireno, que foram acondicionadas em estufa com circulação de ar (modelo B5AFD, DeLeo, Brasil) e desidratadas a 45 °C por 4 h. Os filmes obtidos foram removidos das placas e armazenados em dessecadores (Figura 9), contendo solução saturada de NaBr (58% UR, 25 °C), por pelo menos dois dias antes de serem caracterizados. Por fim, os filmes foram caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas, de barreira, mecânicas, ópticas, estruturais, morfológicas, térmicas e de biodegradabilidade.

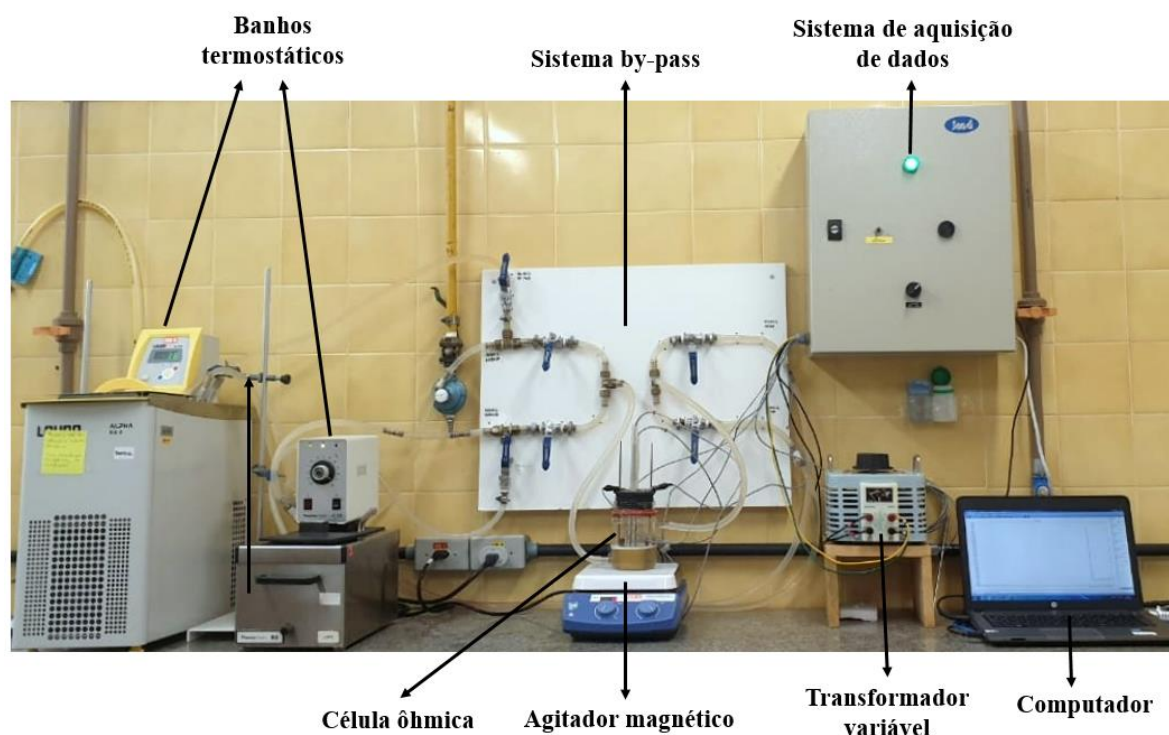
**Figura 9** - Filmes armazenados em dessecador contendo solução saturada de NaBr.



### 4.3.1 Tratamento da solução por aquecimento ôhmico

Para aplicação de aquecimento ôhmico foi utilizado um aparato experimental, demonstrado na Figura 10, desenvolvido pelo Laboratório de Química e Processamento de Alimentos do ICTA. O aparato é constituído de um estabilizador (Forceline, EV 1000 T/2-2, Brasil), um transformador variável de 0 a 220 V (Sociedade Técnica Paulista LTDA, Varivolt, Brasil), uma fonte de alimentação com frequência alternada de 60 Hz, um sistema de aquisição de dados (Novus, modelo Field logger 5, Brasil), um computador, uma célula ôhmica, um agitador magnético (IKA, modelo C-MAG HS7) e um sistema de by-pass, que permite o uso de dois banhos termostáticos (Lauda, modelo T, Alemanha).

**Figura 10** - Aparato experimental de aplicação de aquecimento ôhmico.



A célula ôhmica (Figura 11) foi produzida a partir de um recipiente de vidro Pyrex de 400 mL (8,0 cm de diâmetro e 13,5 cm de altura), encamisado para controle da temperatura, utilizando água circulante. Dois termopares (Novus, modelo pt-100, Brasil) foram acoplados à célula para controle da temperatura. Foram utilizados eletrodos de titânio de 5 cm de altura, com distância mínima e máxima entre os eletrodos de 4,5 cm e 6,5 cm, respectivamente.

**Figura 11** - Célula ôhmica com eletrodos e termopares.



A célula ôhmica foi posicionada sobre um agitador magnético (800 rpm), e a solução foi inicialmente aquecida pela passagem de água quente (88°C), proveniente do banho 1, através da camisa da célula. Quando a solução atingia 75 °C, o banho 1 era desligado e a temperatura de  $75 \pm 1,5$  °C era mantida pela aplicação de aquecimento ôhmico e pela circulação de água fria (20 - 70 °C) advinda do segundo banho termostático. A temperatura do banho 2 era dependente da tensão aplicada, tensões maiores demandavam temperaturas menores no banho. Foram aplicadas tensões que variaram de 30 V (intensidade de campo elétrico de  $5,5 \text{ V cm}^{-1}$ ) a 120 V (intensidade de campo elétrico de  $21,8 \text{ V cm}^{-1}$ ), durante o período de 5 a 20 minutos, de acordo com o planejamento experimental que será detalhado no item **4.5**.

#### **4.3.2 Tratamento da solução por ultrassom**

Para aplicação do ultrassom, foi utilizado o mesmo aparato experimental do aquecimento ôhmico, substituindo-se o transformador variável e os eletrodos por um processador ultrassônico VCX750 (Sonics & Materials Inc), equipado com uma sonda de 25 mm de diâmetro de ponta e frequência de 20 kHz (Figura 12).

**Figura 12** - Aparato experimental de aplicação do ultrassom.



De forma semelhante ao aquecimento ôhmico, a solução filmogênica foi inicialmente aquecida até 75 °C, pela circulação de água quente (88°C) proveniente do banho 1. A temperatura de 75 ± 1,5 °C foi mantida pela aplicação do ultrassom (10s *on* /10s *off*) e pela circulação de água (60 - 70 °C) advinda do banho 2. Foram aplicadas intensidades de ultrassom que variaram de 50 a 100%, durante o período de 5 a 20 minutos, de acordo com o planejamento experimental que será detalhado no item 4.5.

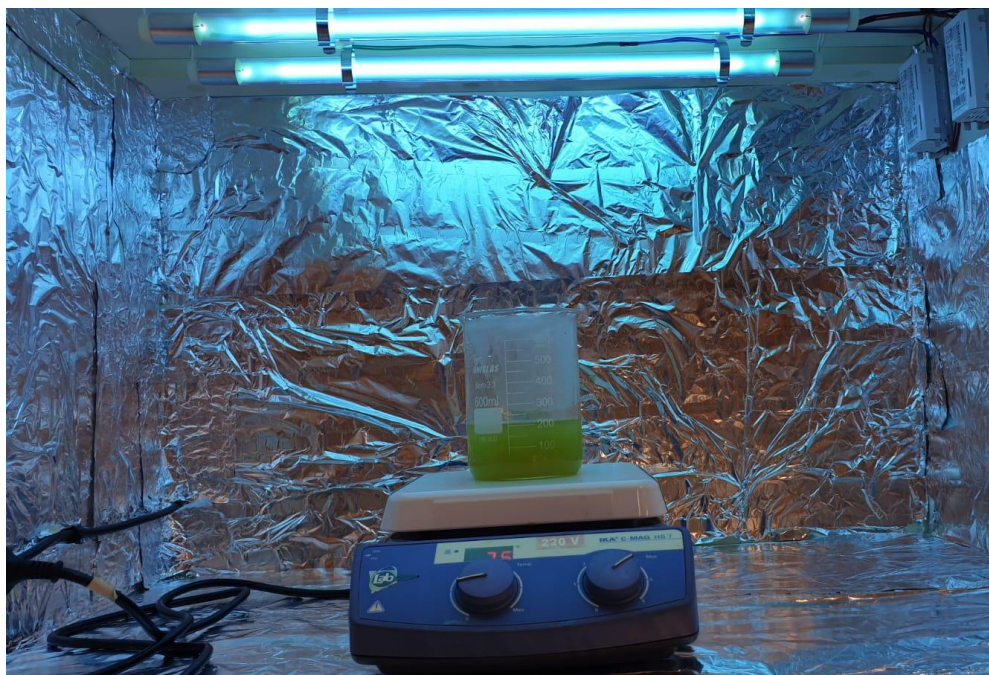
### **4.3.3 Tratamento da solução por radiação ultravioleta**

Para aquecimento inicial da solução, foi utilizado o mesmo aparato experimental empregado nas demais tecnologias. A solução filmogênica foi aquecida até 75 °C, pela passagem de água quente (88°C) através da camisa da célula encamisada. Em seguida, a solução foi transferida para um béquer e armazenada em uma câmara (80 x 50 x 50 cm) adaptada para a aplicação de radiação UV, conforme demonstrado na Figura 13.

A câmara foi totalmente revestida com papel alumínio e equipada com 4 lâmpadas UV (TUV20W G20T10, Sankyo Denki) posicionadas em paralelo no topo, a uma distância de 35 cm da superfície da solução. As lâmpadas operam a um comprimento de onda de 254 nm (UVC). Um agitador magnético com aquecimento (IKA, modelo C-MAG HS7) foi utilizado para manter a temperatura da solução constante em 75 °C durante a aplicação do UV. As lâmpadas foram ligadas cerca de 10 minutos antes dos experimentos, para estabilizar a intensidade da radiação. As soluções filmogênicas foram submetidas a diferentes tempos de

exposição de 0 h (controle), 0,5 h, 1 h e 2 h. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

**Figura 13** - Câmara utilizada para a aplicação de radiação UV.



#### **4.3.4 Filme produzido por aquecimento convencional**

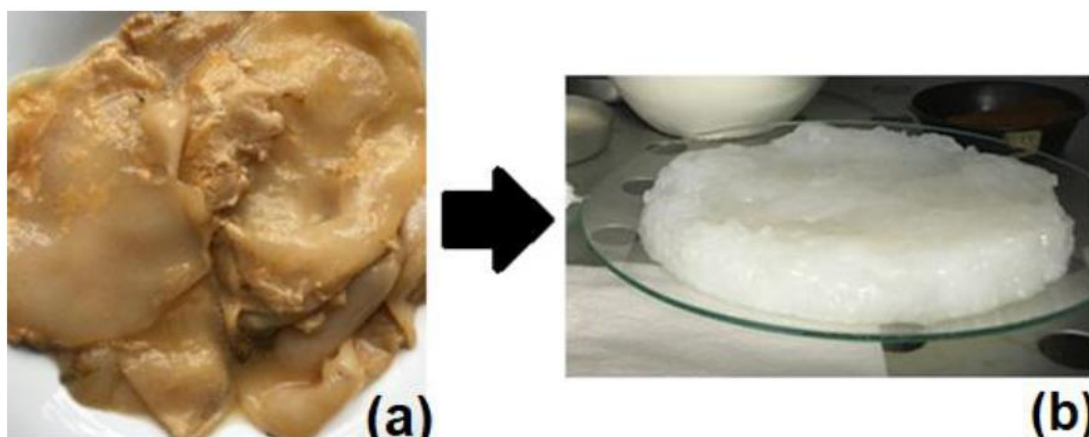
Para avaliar os efeitos não-térmicos das tecnologias empregadas, um filme controle foi produzido utilizando um sistema de aquecimento convencional. O processo de aquecimento inicial foi realizado de forma semelhante às demais tecnologias, ou seja, pela circulação de água quente (88 °C) através da camisa da célula. Entretanto, a manutenção da temperatura em 75 °C foi obtida somente pela circulação de água quente (78 °C), proveniente do segundo banho termostático. A utilização de dois banhos termostáticos foi necessária para regular a taxa de aquecimento e igualar os perfis de temperatura dos filmes produzidos pelas diferentes técnicas. Portanto, quaisquer diferenças observadas entre os tratamentos devem-se exclusivamente aos efeitos não-térmicos das tecnologias aplicadas.

## 4.4 Filmes reforçados com nanofibras de celulose bacteriana

### 4.4.1 Obtenção das nanofibras

A preparação das nanofibras foi realizada por outra aluna do mesmo grupo de pesquisa, sendo descrita em detalhes por Paludo (2021). O SCOBY bruto (Figura 14a) foi inicialmente triturado em um processador convencional (Walita, Philipps) e purificado por lavagem com água destilada e adição de NaOH (1:2), até a verificação de pH neutro. O SCOBY purificado (Figura 14b) foi então diluído em água destilada (1:2) e triturado em um homogeneizador ultraturrax (Ika, T25, China) por 5 min a 15000 rpm, para melhor dispersão da CB como uma etapa de pré-homogeneização. Para a obtenção das nanofibras, foi utilizado um homogeneizador de alta pressão (HPH) (NS 1001 L - Panda 2K, GEA Niro Soavi Brasil) operando a 600 bar em temperatura ambiente.

**Figura 14** - Aparência visual do SCOBY: bruto (a) e após etapa de purificação (b).



### 4.4.2 Obtenção dos filmes reforçados com nanofibras

Para obtenção das soluções filmogênicas reforçadas, 1% das nanofibras de CB (em relação à percentagem mássica de gelatina) foi adicionado à solução filmogênica controle, descrita no item 4.3. A solução foi mantida sob agitação magnética por 30 min a 75 °C, até completa solubilização das nanofibras. Para avaliar a eficácia do HPH, as soluções filmogênicas foram preparadas com adição de dois tipos de amostras de CB: homogeneizadas apenas no ultra-turrax e homogeneizadas no ultra-turrax e HPH.

Após obtenção das soluções reforçadas, procederam-se as etapas seguintes de remoção das bolhas, *casting* da solução, secagem dos filmes, controle da umidade e caracterização dos filmes, conforme detalhado anteriormente.



#### 4.5 Planejamento experimental

Para avaliar o efeito dos parâmetros do aquecimento ôhmico e do ultrassom nas propriedades funcionais dos filmes de gelatina, foram utilizados planejamentos de superfície resposta, também chamados de projetos compostos de segunda ordem (PCSO). A partir do PCSO, é possível obter um modelo de segunda ordem, que correlaciona as variáveis independentes com as respostas obtidas (variáveis dependentes). O delineamento do PCSO é composto de:

- pontos fatoriais ( $2^k$ ), para estimativa dos efeitos principais lineares e efeitos de interações;
- pontos centrais ( $n_0$ ), para detecção da falta de ajuste do modelo linear e estimativa do erro experimental;
- pontos axiais ( $2k$ ), para estimativa dos efeitos quadráticos puros.

O delineamento apresenta cinco níveis de variáveis codificadas como  $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $+\alpha$ ,  $+1$ . O valor de  $\alpha$  é dependente do número de variáveis independentes ( $k$ ), sendo definido pela Equação 1 (COCHRAN; COX, 1992):

$$\alpha = (2^k)^{1/4} \quad (1)$$

As variáveis dependentes estão relacionadas com as variáveis independentes através do modelo de segunda ordem, apresentado na Equação 2:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad (2)$$

em que  $Y_i$  representa as variáveis dependentes,  $\beta_n$  são os coeficientes da regressão, e  $X_1$  e  $X_2$  são os níveis codificados das variáveis independentes.

Para avaliar o efeito do aquecimento ôhmico nas propriedades dos filmes, foram definidas como variáveis independentes a intensidade de campo elétrico ( $V\text{ cm}^{-1}$ ) e o tempo de exposição (min). No caso do ultrassom, as variáveis independentes são a intensidade de ultrassom (%) e o tempo de exposição (min). Portanto, para as duas tecnologias tem-se  $k = 2$  e  $\alpha = 1,414$ . Dessa forma, cada projeto experimental engloba 13 ensaios, sendo 4 pontos fatoriais (combinação dos níveis  $-1$  e  $+1$ ), 4 pontos axiais (uma variável no nível  $\pm \alpha$  e outra no nível  $0$ ) e 5 pontos centrais. O delineamento experimental juntamente com as variáveis independentes,

níveis reais e codificados são apresentados nas Tabelas 1 e 2, para o aquecimento ôhmico e ultrassom, respectivamente.

**Tabela 1** - Delineamento experimental para a aplicação de aquecimento ôhmico.

Ensaio*	Níveis codificados		Níveis reais	
	Intensidade de campo elétrico	Tempo	Intensidade de campo elétrico ( $V\ cm^{-1}$ )	Tempo (min)
1	-1	-1	7,8	7,2
2	1	-1	19,4	7,2
3	-1	1	7,8	17,8
4	1	1	19,4	17,8
5	-1,414	0	5,5	12,5
6	1,414	0	21,8	12,5
7	0	-1,414	13,6	5,0
8	0	1,414	13,6	20,0
9	0	0	13,6	12,5
10	0	0	13,6	12,5
11	0	0	13,6	12,5
12	0	0	13,6	12,5
13	0	0	13,6	12,5

\* Ensaio aleatorizado previamente à experimentação.

**Tabela 2** - Delineamento experimental para aplicação do ultrassom.

Ensaio*	Níveis codificados		Níveis reais	
	Intensidade de ultrassom	Tempo	Intensidade de ultrassom (%)	Tempo (min)
14	-1	-1	57,3	7,2
15	1	-1	92,7	7,2
16	-1	1	57,3	17,8
17	1	1	92,7	17,8
18	-1,414	0	50,0	12,5
19	1,414	0	100,0	12,5
20	0	-1,414	75,0	5,0
21	0	1,414	75,0	20,0
22	0	0	75,0	12,5
23	0	0	75,0	12,5
24	0	0	75,0	12,5
25	0	0	75,0	12,5
26	0	0	75,0	12,5

\* Ensaio aleatorizado previamente à experimentação.

## 4.6 Caracterização dos filmes biodegradáveis

### 4.6.1 Propriedades físico-químicas

#### 4.6.1.1 Espessura

A espessura dos filmes (Figura 15) foi determinada utilizando-se um micrômetro digital (modelo IP40, Digimess, Brasil) com escala de 0-25 mm e precisão de 0,001 mm. A espessura final representa a média aritmética de cinco medidas aleatórias realizadas em cada amostra de filme.

**Figura 15** - Medição da espessura dos filmes com micrômetro digital.



#### 4.6.1.2 Umidade e solubilidade em água

O teor de umidade das amostras foi determinado de acordo com a AOAC (2005), através do método gravimétrico. As amostras de filmes foram recortadas em discos de 2 cm de diâmetro, pesadas e submetidas à secagem em estufa com circulação de ar (modelo B4AFD, DeLeo, Brasil), operando a 105 °C por 24 h.

Após determinação da umidade dos filmes, deu-se sequência a análise de solubilidade, que foi realizada de acordo com metodologia adaptada de Pelissari *et al.* (2013). Para isso, foram adicionados 30 mL de água destilada aos recipientes que continham os filmes secos e estes foram mantidos sob agitação em banho maria a 25 °C por 24 h. Em seguida, o excesso de água foi removido dos recipientes e as amostras foram secas em estufa (105 °C, 24 h), para

determinação da massa do material não solubilizado. A solubilidade em água (Sol) é expressa pela porcentagem de material seco solubilizado, conforme apresentado na Equação 3:

$$\text{Sol (\%)} = \left( \frac{w_i - w_f}{w_i} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

em que  $w_i$  (g) é a massa inicial dos filmes secos e  $w_f$  (g) é a massa final resultante de filme seco não solubilizado.

#### 4.6.2 Permeabilidade ao vapor d'água

A análise de permeabilidade ao vapor d'água foi realizada de acordo com o método analítico padrão (ASTM E96/E96-M, 2016) e procedimento descrito por Pagno *et al.* (2015). Os filmes foram fixados em cápsulas de permeação de alumínio (diâmetro interno de 63 mm e altura de 25 mm) contendo  $\text{CaCl}_2$  anidro granular (0% UR). O conjunto foi então armazenado em uma cuba de vidro (Figura 16) contendo solução saturada de NaCl (75% UR, 25 °C). O ganho de massa das cápsulas foi monitorado após 24 h e a permeabilidade ao vapor d'água (PVA) foi determinada pela Equação 4:

$$\text{PVA} = \frac{w \cdot d}{A \cdot \Delta P \cdot t} \quad (4)$$

em que  $w$  (g) é a massa de água permeada através do filme,  $d$  (mm) é a espessura do filme,  $A$  ( $\text{m}^2$ ) é a área de permeação,  $\Delta P$  (KPa) é a diferença de pressão de vapor entre os dois lados do filme, e  $t$  (h) é o tempo de permeação.

**Figura 16** - Análise de permeabilidade em cuba contendo solução saturada de NaCl.



### 4.6.3 Propriedades mecânicas

A resistência à tração, porcentagem de elongação na ruptura e módulo de Young foram determinados através de testes de tração, de acordo com o método padrão ASTM D882-09 (2009). O equipamento utilizado foi um texturômetro (modelo TA-XT2, Stable Micro Systems, United Kingdom), operando com célula de carga de 5 kg, conforme demonstrado na Figura 17. Os filmes foram recortados em tiras (80 x 10 mm) e sua espessura foi medida em três posições aleatórias. Dez tiras de cada amostra foram analisadas, utilizando separação inicial das garras de 50 mm e velocidade de teste de  $0,8 \text{ mm s}^{-1}$ .

**Figura 17** - Análise das propriedades mecânicas realizada em texturômetro.



### 4.6.4 Propriedades ópticas

#### 4.6.4.1 Cor

A cor dos filmes foi avaliada com um colorímetro (modelo CR-300, Minolta, Japão) (Figura 18), utilizando os parâmetros de cor CIELab:  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  (verde - vermelho) e  $b^*$  (azul - amarelo). Um disco branco ( $L_0^*$ : 97,5,  $a_0^*$ : 0,13 e  $b_0^*$ : 1,7) foi utilizado como padrão. Os parâmetros de cor foram obtidos a partir da média de três medições feitas em

diferentes áreas de cada amostra. A partir da Equação 5 (ROTTA *et al.*, 2009), determinou-se, também, a diferença de cor ( $\Delta E$ ) entre os filmes e o disco padrão:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (5)$$

em que  $\Delta L^* = L^* - L_0^*$ ,  $\Delta a^* = a^* - a_0^*$  e  $\Delta b^* = b^* - b_0^*$ ;  $L_0^*$ ,  $a_0^*$  e  $b_0^*$  são os parâmetros de cor do disco padrão e  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  são os parâmetros de cor das amostras.

**Figura 18** - Medição dos parâmetros de cor dos filmes com colorímetro.



#### 4.6.4.2 Transmitância e opacidade

Os filmes foram submetidos à análise de transmissão de luz utilizando um espectrofotômetro (modelo UV-1800, Shimadzu, Japão), operando na faixa de comprimentos de onda de 200 a 800 nm, de acordo com método descrito por Wang *et al.* (2013). As amostras de filme foram recortadas em retângulos (4 x 1 mm) e aderidas à parede interna de uma cubeta de quartzo. Uma cubeta de teste vazia foi utilizada como referência. A opacidade ( $A$ ,  $\text{mm}^{-1}$ ) dos filmes foi calculada a partir da Equação 6:

$$\text{Opacidade} = \frac{\text{Abs}_{600}}{d} \quad (6)$$

em que  $\text{Abs}_{600}$  é a absorvância a 600 nm, e  $d$  (mm) é a espessura do filme.

## 4.6.5 Propriedades estruturais e morfológicas

### 4.6.5.1 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia da superfície dos filmes foi observada em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (modelo JSM 6060, JEOL, Japão), utilizando tensão de aceleração de 5 kV e ampliação de 1000x. Para isso, as amostras de filme foram fixadas em *stubs* de alumínio e recobertas com uma fina camada de ouro.

### 4.6.5.2 Difração de raio X

A difração de raios X (DRX) foi realizada em um difratômetro DRX (modelo D2 Phaser, Bruker, EUA), equipado com fonte de radiação CuK $\alpha$  ( $\lambda = 0,15418$  nm), operando a 40 kW e 20 mA. As medições foram realizadas de 5 a 40° a uma taxa de 0,02° min<sup>-1</sup>. O índice de cristalinidade foi calculado como a razão entre a área da contribuição cristalina e a área total do espectro de difração dos filmes.

### 4.6.5.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram determinados em um espectrômetro FTIR (Modelo Frontier, Perkin Elmer, EUA), operando no modo de refletância total atenuada (ATR), de acordo com o método de Xiao *et al.* (2021). A faixa de varredura dos espectros variou de 650 a 4000 cm<sup>-1</sup>, com uma coleção de 32 varreduras/espectro e resolução de 4 cm<sup>-1</sup>.

## 4.6.6 Propriedades térmicas

A estabilidade térmica dos filmes (perda de massa, temperaturas máximas de degradação e massa residual) foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Campo *et al.* (2017). Utilizou-se um analisador termogravimétrico (modelo TGA-Q500, TA Instruments, EUA), conforme apresentado na Figura 19. As amostras (10 ± 1 mg) foram submetidas a uma faixa de temperatura crescente (10 °C min<sup>-1</sup>) no intervalo de temperatura de 25 °C até 650 °C. Ar atmosférico foi utilizado como gás de purga (20 mL min<sup>-1</sup>).

**Figura 19** - Análise de estabilidade térmica em analisador termogravimétrico.



#### **4.6.7 Biodegradabilidade**

A análise de biodegradabilidade dos filmes foi realizada de acordo com metodologia adaptada de Martucci & Ruseckaite (2009). Esse método é baseado na avaliação da biodegradação dos filmes quando os mesmos são enterrados e expostos à microbiota natural encontrada no solo. Recipientes plásticos ( $5,5 \times 6 \times 6,5$  cm) foram preenchidos com solo orgânico natural e usados como meio de degradação dos filmes. As amostras de filmes foram recortadas em retângulos ( $2 \times 3$  cm) e secas em estufa (modelo TLK48, DeLeo, Brasil) a  $60^\circ\text{C}$ , até obtenção de massa constante. Os filmes secos foram acondicionados em malhas de alumínio, previamente secas e pesadas, e estas foram enterradas a uma profundidade de 4 cm da superfície do solo, conforme demonstrando na Figura 20. O experimento foi conduzido por 12 dias, com umidade relativa do solo de aproximadamente 40% (a partir da adição de 10 mL de água, a cada dois dias).



**Figura 20** - Filmes submetidos à análise de biodegradabilidade.



A cada 4 dias, o conjunto malha e filme foi desenterrado, lavado com água destilada e superficialmente seco com a ajuda de um papel filtro. Em seguida, os filmes foram secos a 60 °C, até obtenção de massa constante. A perda de massa dos filmes (WL) após biodegradação no solo foi determinada através da Equação 7:

$$WL(\%) = \left( \frac{w_i - w_t}{w_i} \right) \cdot 100 \quad (7)$$

em que  $w_i$  (g) é a massa inicial da amostra seca, e  $w_t$  (g) é a massa seca no tempo  $t$  (g).

#### 4.7 Análise estatística

Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com nível de significância de 5%, utilizando-se o software Statistica 12.0 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA). Quando não mencionado, as análises foram realizadas em triplicata.

## Capítulo 5 - Resultados

Os resultados serão apresentados na forma de dois artigos científicos. O primeiro artigo intitulado “*Effect of ohmic heating and ultrasound on functional properties of biodegradable gelatin-based films*” refere-se à aplicação das tecnologias de aquecimento ôhmico e ultrassom. Já o segundo artigo intitulado “*Morphology and functional properties of gelatin-based films modified by UV radiation and bacterial cellulose nanofibers*” refere-se aos efeitos da aplicação de radiação UV e da incorporação de nanofibras de celulose bacteriana aos filmes à base de gelatina.

### **ARTIGO 1 - EFFECT OF OHMIC HEATING AND ULTRASOUND ON FUNCTIONAL PROPERTIES OF BIODEGRADABLE GELATIN-BASED FILMS**

Victoria Hermes de Vargas<sup>a</sup>, Ligia Damasceno Ferreira Marczak<sup>a</sup>, Simone Hickmann Flôres<sup>b</sup> and Giovana Domeneghini Mercali<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemical Engineering, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos, 2777, Santana, 90035-007, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>b</sup> Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Agronomia, 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

\* Corresponding author (e-mail: giovana.mercali@ufrgs.br)

**Abstract**

This study aimed to evaluate the effect of ohmic heating (OH) and ultrasound (US) on functional properties of biodegradable gelatin-based films. For OH, electric field strength (30-120 V) and exposure time (5 - 20 min) were evaluated; for US, intensity (50 - 100%) and the exposure time (5 - 20 min) were investigated. Regarding OH, higher mechanical properties (tensile strength and Young's modulus) values were obtained at the lowest electric field strength applied, regardless of the exposure time. For US, tensile strength and Young's modulus values significantly increased with increasing the US intensity and exposure time. Films produced with OH and US with optimized properties were compared to a control film (produced by conventional heating). X-ray diffraction and thermogravimetric analysis indicated that films produced by US and OH showed a more ordered structure, with a higher crystallinity index, and were more thermally stable. The most pronounced effects on mechanical properties were obtained using OH: tensile strength increased from 1.53 MPa (control) to 3.86 MPa. US application reduced film opacity, resulting in a more transparent film with a smoother surface. Both treatments also significantly decreased the water vapor permeability but did not affect film thickness, moisture content, water solubility, and biodegradability. Overall, the treated films had improved mechanical, thermal, and barrier properties; however, these improvements are still not enough to compete with synthetic films. OH and US can be an interesting approach in developing biodegradable films but further studies are needed to better understand their impact on film characteristics.

**Keywords:** gelatin; biodegradable films; emerging technologies; surface-response methodology; packaging.

## 1 Introduction

The environmental problems caused by the growing use of synthetic plastics and the concern regarding their non-renewable and non-biodegradable nature have encouraged several research groups to develop more sustainable alternatives. In this context, biodegradable films and edible coatings, obtained from renewable sources, have been considered promising in the food packaging field (Wihodo & Moraru, 2013). These films are mostly composed of a biopolymer (protein, lipid, and/or polysaccharide), responsible for synthesizing a cohesive structure, and a solvent, usually water or ethanol. Additives can also be incorporated to improve film properties and structure (Dubey & Dubey, 2020). Among biopolymers, gelatin obtained from various sources, as cattle (Cardoso et al., 2016; Ibarguren et al., 2015; S. U. Kadam et al., 2015), pork (Kowalczyk & Biendl, 2016; Peña-Rodríguez et al., 2015; Tyburcy & Kozyra, 2010) and fish (Hosseini et al., 2016; Ojagh et al., 2011; Park et al., 2021), has been successfully used to develop biodegradable films.

Gelatin is a water soluble protein characterized by the random configuration of polypeptide chains in an aqueous solution. It is obtained from the partial hydrolysis of collagen, a fibrous insoluble protein found in bones, skin, and cartilages of vertebrate and invertebrate animals (Shankar et al., 2016). Gelatin was one of the first materials used as a carrier for bioactive components and has been extensively studied due to its film-forming capacity. Its particular features, such as low cost, high availability, interesting functional attributes, good mechanical and optical properties, high sensory acceptability, and efficiency as a barrier against light and oxygen (Gómez-Guillén et al., 2009), make gelatin a promising component of food packaging materials. In particular, gelatin residues from encapsulating materials can be revalued as a potential source for the development of biodegradable films (Ramos et al., 2016).

Although biopolymer films offer great potential as mass transfer barriers to improve food quality, their industrial applications are still limited (Wu et al., 2002). Compared to synthetic plastics, biopolymer films have lower mechanical strength, lower resistance to gases and liquids, lack of evaluation on edibility and biodegradability, and difficult scale-up (Jeevahan et al., 2020). Thus, several strategies have been followed to overcome these drawbacks, such the use of emerging technologies during film production. Casting is the most widely used technique for film production; it consists of developing a film-forming solution, in which the biopolymer is dissolved in solvents, followed by spreading it over Petri dishes and solvent evaporation (Luo et al., 2022). This process is carried out by conventional heating systems, as indirect water baths or heating plates. Ohmic heating (OH) and ultrasound (US) are

alternatives of novel technologies that can be used to replace conventional heating processes, improving mechanical and barrier film properties.

OH is defined as a process wherein alternating electrical current is passed through a material (which offers electrical resistance) to heat it by internal energy generation (Sastry & Barach, 2000). Heating rates depend on the electric field strength applied and the electrical conductivity of the sample (Falguera et al., 2011). The main OH advantage is its ability to heat materials rapidly and uniformly, preserving nutritional and sensory properties (Sastry, 2008). In addition to thermal effects, OH shows non-thermal effects associated with the passage of electricity. These effects may contribute to improve film properties because they can change the way the biopolymer interacts with other compounds in the film-forming solution. Some studies have already reported the application of OH in film production: films made from soy protein (Lei et al., 2007), chitosan (Souza et al., 2009, 2010), chitosan/methylcellulose (García et al., 2009b), whey protein (Pereira et al., 2010), chitosan/starch (Coelho et al., 2017), gelatin (Iahnke, Vargas, et al., 2019), and keratin (Tinoco et al., 2020).

US refers to sound waves with a frequency higher than the audible range for humans. It can be classified into two categories: low-intensity and high-intensity US. The low-intensity US uses power levels less than  $1 \text{ W cm}^{-2}$ , while the high-intensity US (power ultrasound) uses higher power levels, typically in the range of  $10 - 1000 \text{ W cm}^{-2}$  (Feng & Yang, 2006). Power ultrasound has been used in many food applications due to its ability to modify material properties and accelerate certain chemical reactions (Dolatowski et al., 2007). The thermal, mechanical and chemical effects involved are attributed to the rapid formation and collapse of cavitation bubbles, generating shear stresses. These shear forces and energy inputs are strong enough to break intermolecular bonds (Leadley & Williams, 2006; O'Donnell et al., 2010). In film development, US has already been used in the production of protein (D. M. Kadam et al., 2013; C. C. Liu et al., 2004; Rodriguez-Turienzo et al., 2012), polysaccharide (Borah et al., 2017; Fabra et al., 2017; Kang & Min, 2010; Vera et al., 2020), and composite films (Wang et al., 2020; Zhong et al., 2015).

To the best of our knowledge, few researchers have addressed the potential use of these emerging technologies to produce gelatin-based films. Therefore, this study aimed to develop biodegradable gelatin-based films using OH and US, focusing on establishing relationships between processing variables and film properties (cause-and-effect relationships).

## 2 Materials and methods

### 2.1 Materials

The gelatin residue (GR), mainly composed of bovine gelatin (41%), water (35%), and glycerol (24%), was used for the production of biodegradable gelatin-based films. These residues result from linseed oil nutraceutical capsules processing and were supplied by the Chemical Pharmaceutical Tiaraju Laboratory (Rio Grande do Sul, Brazil).

### 2.2 Film preparation

The casting technique was used to produce biodegradable films. The film-forming solution was prepared by mixing 70 g of GR and 100 g of distilled water (conditions defined according to preliminary tests). The addition of a plasticizer was not necessary as GR has glycerol in its composition. The solution was heated up to 75 °C under magnetic stirring and treated by OH or US, according to the methodology described in the following sections. The treated solution was placed in a vacuum desiccator to remove air bubbles. Then, the film-forming solution was poured in polystyrene Petri dishes (0.13 g cm<sup>-2</sup>) and dried in an air-circulation oven (model B5AFD, DeLeo, Brazil) at 45 °C for 4 h, according to the methodology described by Iahnke, Vargas, et al. (2019). After drying, the obtained films were conditioned in desiccators containing a saturated sodium bromide solution (58% RH, 25 °C) for at least 48 hours before characterization.

#### 2.2.1 Ohmic heating application

The experimental OH setup used is described in details by Mercali et al. (2012). It consists of a stabilizer (Forceline, EV 1000 T/2-2, Brazil), a variable transformer from 0 to 220 V (Sociedade Técnica Paulista LTDA, Varivolt, Brazil), a power supply with an alternating frequency of 60 Hz, a data acquisition system (Novus, model Field logger 5, Brazil) linked to a computer, an ohmic cell, and a bypass system which allows the use of two thermostatic baths. The ohmic cell was made of a 400 ml water jacket glass vessel. Two temperature sensors (Novus, model pt-100, Brazil) and two curved titanium electrodes with 5 cm height were used. The minimum and maximum inter-electrode gaps were 4.5 cm and 6.5 cm, respectively.

The ohmic cell was placed on a magnetic stirrer (IKA, model C-MAG HS7) and the film-forming solution was initially heated by passing hot water (88°C) through the jacket of the cell. When the solution reached 75 °C, the hot bath (Lauda, model T, Germany) was turned off

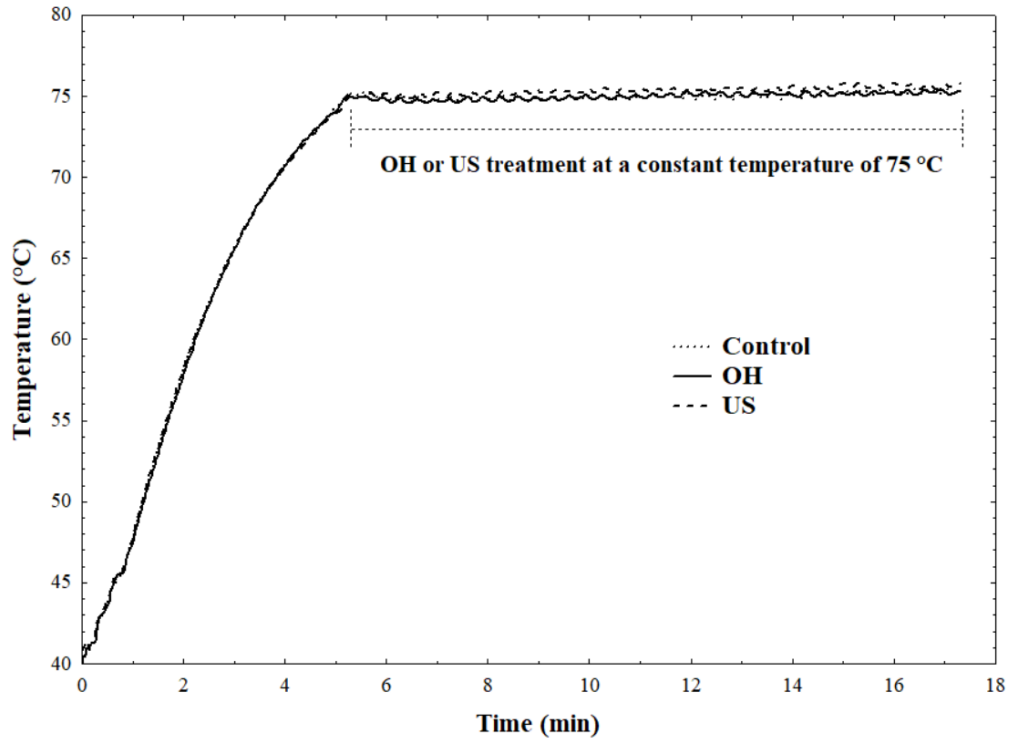
and the temperature of  $75 \pm 1.5$  °C was held by applying OH and by circulating cool water (20 - 70 °C) from another temperature-controlled water bath (Lauda, model T, Germany). The temperature of the cool bath was dependent on the applied voltage. The gelatin-based films were produced with the application of different voltages ranging from 30 V (average electric field strength of  $5.5 \text{ V cm}^{-1}$ ) to 120 V (average electric field strength of  $21.8 \text{ V cm}^{-1}$ ), for a period of 5 to 20 minutes, according to an experimental design.

### ***2.2.2 Ultrasound application***

For US application, ultrasonic processor (Sonics & Materials Inc, VCX750) equipped with a probe (25 mm diameter tip), with a frequency of 20 kHz, was used connected to an analogous experimental apparatus described in section 2.2.1. Similar to OH, the film-forming solution was heated up to 75 °C by a thermostatic water bath (88 °C) connected to the jacket of the cell. The temperature of  $75 \pm 1.5$  °C was held by applying US (10s *on* /10s *off*) and by circulating cool water from another water bath (60 - 70 °C). US intensities ranging from 50 to 100% were applied during a period of 5 to 20 minutes, following an experimental design.

### ***2.2.3 Conventional heating application***

To evaluate the non-thermal effects of OH and US on film properties, a control film was produced using a conventional heating system, without OH or US application. For this purpose, a thermostatic water bath (88 °C) connected to the cell was used to heat the samples up to 75 °C. The samples were kept at this temperature by the circulating water from another water bath (set at 78 °C), under magnetic stirring for 12.5 minutes. The use of two thermostatic baths was necessary to regulate the heating rate and to match the temperature profiles of films produced by all technologies. Therefore, any differences observed between treatments are exclusively due to non-thermal effects of the applied technologies. **Figure 1** shows a typical temperature profile showing identical temperature histories for control, OH (75 V and 12.5 minutes) and US (75% and 12.5 minutes) films.



**Figure 1** - Temperature profiles of the gelatin-based film-forming solutions: control (12.5 min), OH (ohmic heating at 75 V and 12.5 minutes), and US (ultrasound at 75% and 12.5 minutes).

### 2.3 Experimental design

A surface-response methodology was employed to evaluate the effect of independent variables of OH (electric field strength,  $C_1$ , and exposure time,  $C_2$ ) and US (US intensity,  $C_1$ , and exposure time,  $C_2$ ) on the selected film properties (dependent variables). Thirteen experiments for each technology were conducted using a  $2^2$  full-factorial central composite design with 4 factorial points (estimation of linear main effects and interaction effects), 5 central points (estimation of pure error) and 4 axial points (estimation of pure quadratic effects).

The dependent variables evaluated were: moisture content (MC), water solubility (WS), water vapor permeability (WVP), tensile strength (TS), elongation at break (EAB), and Young's modulus (YM). Dependent variables are related to independent variables through a second-order model, Eq. (1):

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad (1)$$

where  $Y_i$  represents the dependent variables,  $\beta_n$  are the regression coefficients, and  $X_1$  and  $X_2$  are the coded levels of the independent variables.



## 2.4 Film characterization

### 2.4.1 Film thickness

Film thickness was determined using a digital micrometer (model IP40, Digimess, Brazil) with a range of 0-25 mm and an accuracy of 0.001 mm. The final thickness represents the average of five measurements made randomly along each sample evaluated.

### 2.4.2 Moisture content and water solubility

Film samples (2 cm in diameter) were dried in an oven (model B4AFD, DeLeo, Brazil) at 105 °C, for 24 h, and their MC was analyzed gravimetrically (AOAC, 2005). The WS analysis was performed according to the methodology described by Pelissari et al. (2013), with modifications. The dry film samples were immersed in 30 mL of distilled water and held under soft stirring in a water bath at 25 °C, for 24 h. The WS (%) was expressed by the percentage of dry solubilized material, using Eq. (2):

$$WS(\%) = \left( \frac{w_i - w_f}{w_i} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

where  $w_i$  (g) is the initial dry weight of the film samples, and  $w_f$  (g) is the final dry weight of the samples.

### 2.4.3 Water vapor permeability

The WVP analysis was performed according to the standard analytical method (ASTM E96/E96-M, 2016) and the methodology described by Pagno et al. (2015). Film samples were fixed in aluminum permeation cells (inner diameter of 63 mm and height of 25 mm) filled with granular anhydrous calcium chloride (0% RH) and hermetically sealed. The system was then stored in a glass chamber containing saturated sodium chloride solution (75% RH, 25°C). The weight gain of the capsules was monitored after 24 h, and WVP was calculated using Eq. (3):

$$WVP = \frac{w \cdot d}{A \cdot \Delta P \cdot t} \quad (3)$$

where  $w$  (g) is the weight of water permeated through the film,  $d$  (mm) is the thickness of the film,  $A$  (m<sup>2</sup>) is the permeation area,  $\Delta P$  (KPa) is the water vapor pressure difference between the two sides of the film, and  $t$  (h) is the permeation time.

#### 2.4.4 Mechanical properties

The mechanical properties of films were evaluated by TS, which is the maximum stress supported by the film until the moment of its collapse; EAB, which is a measure of film flexibility and defines the film ability to deform before collapsing; and YM, which is related to the rigidity of the material. A texture analyzer (model TA-XT2, Stable Micro Systems, United Kingdom) with a load cell of 5 kg was used, according to the standard method ASTM D882-09 (2009). The films were cut into strips (80 x 10 mm), and their thickness was measured at three random positions. Ten strips of each film sample were analyzed, using an initial grip separation of 50 mm and test speed of 0.8 mm s<sup>-1</sup>.

#### 2.4.5 Color

The color of the films was evaluated with a colorimeter (model CR-300, Minolta, Japan), using the CIELab color parameters: L\* (luminosity), a\* (red-green) and b\* (yellow-blue). A white disc (L<sub>0</sub>\*: 97.5; a<sub>0</sub>\*: 0.13; and b<sub>0</sub>\*: 1.7) was used as a standard. The color parameters were obtained from the average of three measurements made on different areas of each sample. The color difference ( $\Delta E$ ) between the standard disc and the films was determined using Eq. (4) (Rotta et al., 2009):

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (4)$$

where  $\Delta L^* = L^* - L_0^*$ ,  $\Delta a^* = a^* - a_0^*$ , and  $\Delta b^* = b^* - b_0^*$ ; L<sub>0</sub>\*, a<sub>0</sub>\*, and b<sub>0</sub>\* are the standard color values, and L\*, a\*, and b\* are the films color values.

#### 2.4.6 Light transmission and opacity

An ultraviolet (UV) spectrophotometer (model UV-1800, Shimadzu, Japan) was used to evaluate the barrier properties of films against UV and visible light at the wavelength range between 200 and 800 nm, according to the method described by Wang et al. (2013). Films were cut into rectangles (4 x 1 mm) and directly placed in a spectrophotometer test cell. An empty test cell was used as a reference. The opacity (OP) of the films was calculated by Eq. (5):

$$OP = \frac{Abs_{600}}{d} \quad (5)$$

where Abs<sub>600</sub> is the value of absorbance at 600 nm and d (mm) is the correspondent film thickness.

#### ***2.4.7 X-ray diffraction***

X-ray diffraction (XRD) was carried out on XRD diffractometer (model D2 Phaser, Bruker, USA), equipped with a CuK $\alpha$  radiation source ( $\lambda = 0.15418$  nm), operating at 40 kW and 20 mA. Measurements were taken from 5 to 40° at a rate of 0.02° min<sup>-1</sup>. The crystallinity index was calculated as the ratio between the area of the crystalline contribution and the total area of the films diffraction spectrum.

#### ***2.4.8 Thermogravimetric analysis***

Thermogravimetric analysis (TGA) was performed according to Campo et al. (2017). Film samples ( $10 \pm 1$  mg) were scanned from 25 to 650 °C by a thermogravimetric analyzer (TGA Q500, TA Instruments, USA), at a heating rate of 10 °C min<sup>-1</sup> and using air as the purge gas (20 mL min<sup>-1</sup>).

#### ***2.4.9 Film surface characteristics***

The surface morphology of the upper side (drying surface) of films was observed using a scanning electron microscope (model JSM 6060, JEOL, Japan), with an accelerating voltage of 5 kV and a magnification of 1000x. Film samples were fixed in aluminum stubs and covered with a thin layer of gold.

#### ***2.4.10 Fourier transformation infrared***

The Fourier transformation infrared (FTIR) spectra of film samples was determined using an FTIR Spectrometer (Model Frontier, Perkin Elmer, USA) at the attenuated total reflectance (ATR) mode, according to the method of Xiao et al. (2021). The scan range of the spectra varied from 650-4000 cm<sup>-1</sup>, with a collection of 32 scans/spectrum and a resolution of 4 cm<sup>-1</sup>.

#### ***2.4.11 Indoor soil burial biodegradation***

Indoor soil burial biodegradation was evaluated according to the methodology described by Martucci & Ruseckaite (2009), with some modifications. This method is based on evaluating film biodegradation when they are buried and exposed to the natural microbiota found in the soil. For this purpose, plastic boxes (5.5 x 6 x 6.5 cm) were filled with natural organic soil (Garden Plus, Brazil). Film samples were cut into rectangles (2 x 3 cm) and dried at 60 °C, until constant weight. The dried films were placed in aluminum mesh and were buried at a depth of 4 cm from the soil surface. The experiment was carried out for 12 days with soil relative

humidity of approximately 40%. The weight loss of films (WL, %) after soil biodegradation was determined by Eq. (6):

$$WL (\%) = \left( \frac{w_0 - w_t}{w_0} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

where  $w_0$  (g) is the initial dry weight and  $w_t$  (g) is the remaining dried weight at time  $t$ .

## 2.5 Statistical analyses

Data were evaluated by analysis of the variance (ANOVA) and Tukey test at a significance level of 5%, using the software Statistica 12.0 (Statsoft Inc., Tulsa, USA). When not mentioned, analyses were performed in triplicate.

## 3 Results and discussion

### 3.1 Effect of ohmic heating application on film properties

The full-factorial  $2^2$  central composite design and responses regarding OH application are presented in **Table 1**. The following dependent variables were evaluated: moisture content (MC), water solubility (WS), water vapor permeability (WVP), tensile strength (TS), elongation at break (EAB), and Young's modulus (YM). The estimated effects (linear, quadratic, and interaction) of the independent variables (factors) on each dependent variable are described in **Table S1** (supplementary material).

**Table 1** - Full-factorial 2<sup>2</sup> central composite design and responses for ohmic heating application.

Test	Independent variables				Dependent variables					
	Coded level		Real level		MC (%)	WS (%)	WVP*	TS (MPa)	EAB (%)	YM (MPa)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>						
1	-1	-1	43.2	7.2	22.18	36.79	0.66	3.77	219.49	6.53
2	1	-1	106.8	7.2	21.71	35.29	0.59	2.75	229.62	5.37
3	-1	1	43.2	17.8	21.07	37.60	0.52	3.81	219.67	6.42
4	1	1	106.8	17.8	24.19	37.57	0.69	2.74	247.40	5.40
5	-1.414	0	30.0	12.5	23.36	37.73	0.75	3.86	234.88	6.81
6	1.414	0	120.0	12.5	23.21	35.57	0.58	2.53	213.67	5.15
7	0	-1.414	75.0	5.0	23.89	36.29	0.74	3.46	203.08	6.30
8	0	1.414	75.0	20.0	23.38	35.45	0.59	3.59	199.88	6.33
9	0	0	75.0	12.5	22.65	37.68	0.62	3.42	214.02	6.19
10	0	0	75.0	12.5	20.64	38.94	0.71	3.57	276.15	6.27
11	0	0	75.0	12.5	22.35	35.48	0.67	3.48	212.64	6.13
12	0	0	75.0	12.5	21.11	35.31	0.56	3.32	245.32	6.08
13	0	0	75.0	12.5	22.86	36.66	0.56	3.53	233.22	6.22

\*WVP = g mm m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> kPa<sup>-1</sup>

C<sub>1</sub>: electric field strength (V); C<sub>2</sub>: OH exposure time (min); MC: moisture content; WS: water solubility, WVP: water vapor permeability; TS: tensile strength; EAB: elongation at break; YM: Young's modulus.

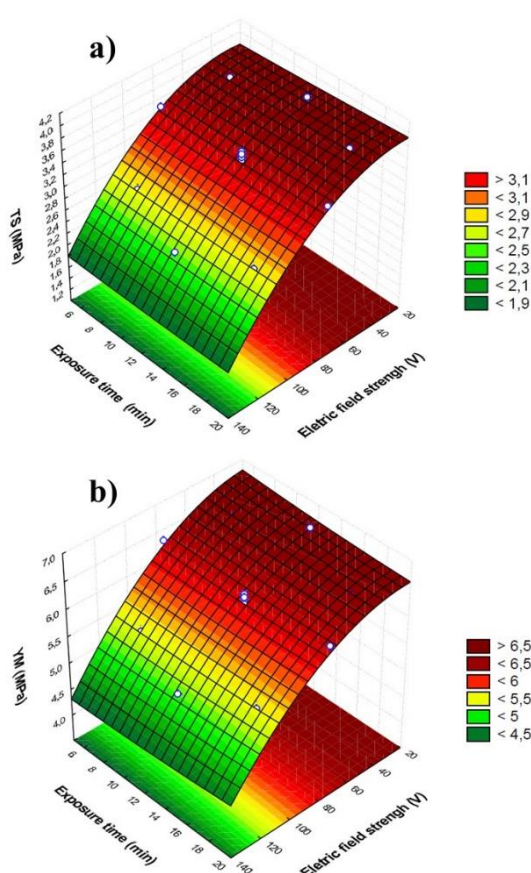
**Table S1** - Estimated effects and analysis of variance (p-values) of OH treated films for the following dependent variables: moisture content (MC), water solubility (WS), water vapor permeability (WVP), tensile strength (TS), elongation at break (EAB), and Young's modulus (YM).

Factor	MC		WS		WVP		TS		EAB		YM	
	Effect	Pv	Effect	Pv	Effect	Pv	Effect	Pv	Effect	Pv	Effect	Pv
Mean	21.92	0.00	37.22	0.00	0.62	0.00	<b>3.46</b>	<b>0.00</b>	236.27	0.00	<b>6.18</b>	<b>0.00</b>
C <sub>1</sub> (L)	0.61	0.45	-1.15	0.23	-0.04	0.53	<b>-0.85</b>	<b>&lt;0.05</b>	1.96	0.91	<b>-1.13</b>	<b>&lt;0.05</b>
C <sub>1</sub> (Q)	0.77	0.38	-0.29	0.76	0.02	0.77	<b>-0.46</b>	<b>&lt;0.05</b>	-3.91	0.83	<b>-0.31</b>	<b>&lt;0.05</b>
C <sub>2</sub> (L)	0.16	0.84	0.47	0.60	-0.06	0.27	0.05	0.58	3.35	0.85	-0.01	0.91
C <sub>2</sub> (Q)	1.13	0.21	-1.07	0.29	0.02	0.74	0.05	0.56	-26.71	0.18	0.03	0.79
C <sub>1</sub> (L) · C <sub>2</sub> (L)	1.80	0.14	0.73	0.57	0.11	0.18	-0.02	0.87	8.80	0.72	0.07	0.60

Pv: p-value; C<sub>1</sub>: electric field strength; C<sub>2</sub>: OH exposure time.

**Table S1** shows that MC, WS, WVP, and EAB were not significantly affected by the OH exposure time and the electric field strength. On the other hand, mechanical properties, in particular the TS and YM, were significantly affected ( $p$ -value  $< 0.05$ ) by linear and quadratic effects of the electric field strength. In addition, the linear effect is negative, which means that TS and YM decrease with increasing electric field strength. **Figure 2** shows the response surfaces for TS (**Figure 2a**) and YM (**Figure 2b**) in which this effect can be observed.

The highest values of TS and YM are obtained for the lowest electric field strength value, regardless of the exposure time. This is an interesting result as high intensities are not required to obtain improved film properties. This is in good agreement with the results found for gelatin films by Iahnke, Vargas, et al. (2019): films subjected to an electric field at 60 V had greater mechanical properties (TS: 6.62 MPa; YM: 10.29 MPa) than films produced at 120 V (TS: 3.26 MPa; YM: 7.89 MPa). On the other hand, Souza et al. (2010) did not find differences in mechanical properties between chitosan films electrically treated at 100 or 200 V  $\text{cm}^{-1}$ . Therefore, the effect of OH technology on these functional properties is not yet fully comprehended and may differ depending on the polymer material.



**Figure 2** - Surface response for a) tensile strength (TS) and b) Young's modulus (YM) as a function of exposure time (min) and electric field strength (V).

The regression coefficients for the models that represent TS and YM, obtained by fitting experimental data to Equation (1), are presented in the following equations:

$$\text{TS (MPa)} = 3.756 + 0.00790 C_1 - 0.000157 C_1^2 \quad (7)$$

$$\text{YM (MPa)} = 6.652 + 0.00539 C_1 - 0.000154 C_1^2 \quad (8)$$

where  $C_1$  is the electric field strength (V).

These coefficients were obtained considering the real levels of the variables, including only significant factors ( $p$ -value  $< 0.05$ ). The coefficients of determination  $R^2$  (0.97 and 0.96 for TS and YM, respectively) were very close to 1, indicating an adequate fit to experimental data. To verify the significance of the models that represent TS and YM, analysis of variance (ANOVA) was conducted, and the results indicate that all models were significant with no lack of fit (calculated  $F >$  tabulated  $F$ ), suggesting they satisfactorily represented the relationship between responses and factors.

The optimized responses to maximize TS and YM were determined according to Eqs. (7) and (8). The predicted target values were 3.86 MPa and 6.81 MPa for TS and YM, respectively. The best combination of the two variables are the lowest levels of electric field strength (30 V) and exposure time (5 min). The film with the greatest mechanical properties (experiment 5, produced at 30 V and 12.5 min) was chosen to be compared with a control film to better understand the non-thermal effects of OH on gelatin-based film properties.

### 3.2 Effect of ultrasound application on film properties

The full-factorial  $2^2$  central composite design and responses for US application are presented in **Table 2**. The estimated effects (linear, quadratic, and interaction) of the independent variables (factors) on each dependent variable are shown in **Table S2** (supplementary material).

**Table 2** - Full-factorial 2<sup>2</sup> central composite design and responses for ultrasound application.

Test	Independent variables				Dependent variables					
	Coded level		Real level		MC (%)	WS (%)	WVP*	TS (MPa)	EAB (%)	YM (MPa)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>						
14	-1	-1	57.3	7.2	22.15	36.27	0.763	1.76	245.33	2.21
15	1	-1	92.7	7.2	20.76	37.60	0.700	2.13	289.29	3.03
16	-1	1	57.3	17.8	22.58	36.11	0.813	1.85	288.68	2.34
17	1	1	92.7	17.8	21.87	34.82	0.838	2.18	281.88	3.04
18	-1.414	0	50.0	12.5	20.68	38.65	0.892	1.64	244.88	2.01
19	1.414	0	100.0	12.5	22.47	38.08	0.785	2.25	252.54	3.17
20	0	-1.414	75.0	5.0	22.59	37.67	0.873	1.81	281.11	2.47
21	0	1.414	75.0	20.0	21.53	36.91	0.775	1.96	241.83	2.84
22	0	0	75.0	12.5	20.24	34.49	0.869	1.87	269.16	2.72
23	0	0	75.0	12.5	22.33	35.52	0.791	1.86	278.15	2.59
24	0	0	75.0	12.5	22.81	36.36	0.776	1.86	267.47	2.51
25	0	0	75.0	12.5	21.71	36.51	0.741	1.84	274.20	2.63
26	0	0	75.0	12.5	21.38	35.41	0.728	1.89	264.02	2.57

\*WVP = g mm m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> kPa<sup>-1</sup>

C<sub>1</sub>: US intensity (%); C<sub>2</sub>: US exposure time (min); MC: moisture content; WS: water solubility, WVP: water vapor permeability; TS: tensile strength; EAB: elongation at break; YM: Young's modulus.

**Table S2** - Estimated effects and analysis of variance (p-values) of US treated films for the following dependent variables: moisture content (MC), water solubility (WS), water vapor permeability (WVP), tensile strength (TS), elongation at break (EAB) and Young's modulus (YM).

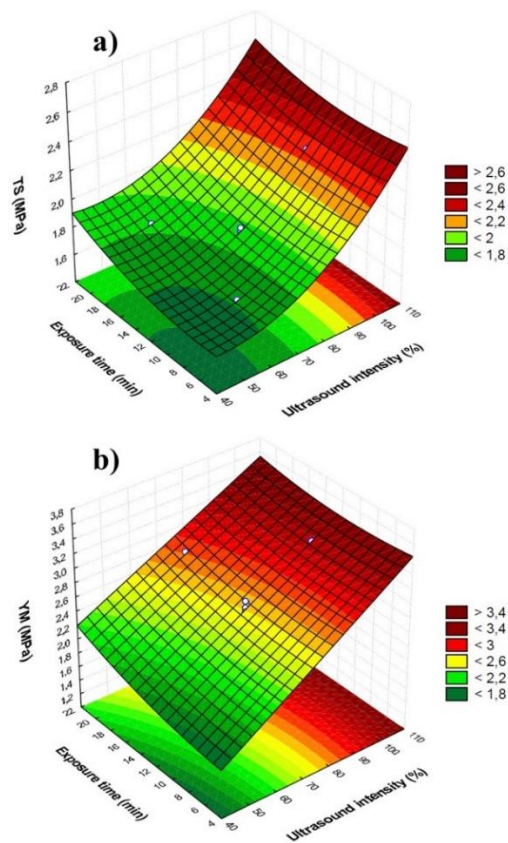
Factor	MC		WS		WVP		TS		EAB		YM	
	Effect	Pv	Effect	Pv	Effect	Pv	Effect	Pv	Effect	Pv	Effect	Pv
Mean	21.69	0.00	35.66	0.00	0.78	0.00	<b>1.86</b>	<b>0.00</b>	270.59	0.00	<b>2.60</b>	<b>0.00</b>
C <sub>1</sub> (L)	0.11	0.89	-0.19	0.81	-0.05	0.36	<b>0.39</b>	<b>&lt;0.05</b>	12.01	0.37	<b>0.79</b>	<b>&lt;0.05</b>
C <sub>1</sub> (Q)	-0.11	0.89	1.89	0.06	0.03	0.57	<b>0.11</b>	<b>&lt;0.05</b>	-11.28	0.42	0.00	0.97
C <sub>2</sub> (L)	0.01	0.98	-1.00	0.24	0.01	0.81	<b>0.09</b>	<b>&lt;0.05</b>	-4.91	0.70	<b>0.17</b>	<b>&lt;0.05</b>
C <sub>2</sub> (Q)	0.38	0.65	0.82	0.36	0.02	0.76	0.05	0.16	1.47	0.91	0.07	0.31
C <sub>1</sub> (L) · C <sub>2</sub> (L)	0.34	0.75	-1.31	0.27	0.04	0.54	-0.02	0.67	-25.38	0.19	-0.06	0.49

Pv: p-value; C<sub>1</sub>: US intensity; C<sub>2</sub>: US exposure time.



Similar to OH, only TS and YM were significantly affected by US parameters. Both dependent variables were affected by US intensity (linear) and exposure time (linear), with a more pronounced effect of US intensity. For TS, a significant quadratic effect of US intensity was also observed. The independent variables had a positive effect on TS and YM; therefore, the highest values of TS and YM were obtained at the highest levels of US intensity and exposure time, as verified in the response surfaces presented in **Figure 3**.

The effect of US parameters on mechanical properties of films has been previously reported, with similar results. Gul et al. (2018) produced nanoemulsion films of hazelnut flour protein and clove essential oil using US applied at different times (2 - 6 min) and intensities (50% - 100%). The highest TS was obtained at the highest intensity and time evaluated. Csiszar et al. (2016) observed that TS significantly increases with increasing sonication time of nanocrystalline cellulose suspensions. Zhong et al. (2015) studied the effects of exposure time (0 - 30 min) and US power (90 - 270 W) on mechanical properties of methylcellulose and stearic acid composite films. In this case, the optimal value of TS was obtained for the sample treated for 10 min and 180 W, suggesting that the excessive exposure to US gave rise to superfluous spaces in the polymer matrix, affecting the film performance.



**Figure 3** - Surface response for a) tensile strength (TS) and b) Young's modulus (YM) as a function of exposure time (min) and US intensity (%).

The regression coefficients for the models that represent TS and YM, obtained by fitting experimental data to Equation (1), are presented in the following equations:

$$\text{TS (MPa)} = 1.909 - 0.01452 C_1 + 0.00830 C_2 + 0.00017 C_1^2 \quad (9)$$

$$\text{YM (MPa)} = 0.754 + 0.02235 C_1 + 0.01563 C_2 \quad (10)$$

where  $C_1$  is the US intensity (%) and  $C_2$  is the US exposure time (min).

The coefficients of determination  $R^2$  (0.95 and 0.96 for TS and YM, respectively) were very close to 1, indicating an adequate fit to experimental data. The analysis of variance (ANOVA) indicated that all models were significant with no lack of fit (calculated  $F >$  tabulated  $F$ ), suggesting they satisfactorily represented the relationship between responses and factors.

The optimized response to maximize TS and YM were the highest levels of US intensity (100%) and exposure time (20 min), providing predicted target values of 2.25 MPa and 3.17 MPa for TS and YM, respectively. Experiment 19 (produced at 100% of US intensity and 12.5 min) presented the greatest mechanical properties values, and therefore was selected for comparison with a control film.

### **3.3 Non-thermal effects of ohmic heating and ultrasound on film properties**

To evaluate the non-thermal effects of each technology, films with optimized mechanical properties were compared to films produced with conventional heating. It is important to highlight that all technologies were applied under the same temperature profile, aiming to exclude temperature as a variable during the experiments. **Table 3** presents gelatin-based film properties for films produced by OH (30 V and 12.5 min, OH30), US (100% and 12.5 min, US100) and by conventional heating (12.5 min, control). These properties will be discussed separately in the following sections.

**Table 3** - Thickness (FT), moisture content (MC), water solubility (WS), tensile strength (TS), elongation at break (EAB), Young's modulus (YM), water vapor permeability (WVP), color parameters (L\*, a\* and b\*), and color difference ( $\Delta E$ ) of gelatin-based films produced by different technologies.

Film	FT (mm)	MC (%)	WS (%)	TS (MPa)	EAB (%)	YM (MPa)	WVP*	Color parameters			
								L*	a*	b*	$\Delta E$
Control	0.324 ± 0.009 <sup>a</sup>	22.92 ± 0.91 <sup>a</sup>	37.45 ± 1.08 <sup>a</sup>	1.53 ± 0.09 <sup>c</sup>	244.27 ± 12.34 <sup>a</sup>	2.14 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.91 ± 0.03 <sup>a</sup>	89.14 ± 0.52 <sup>a</sup>	-2.02 ± 0.05 <sup>a</sup>	9.89 ± 0.28 <sup>b</sup>	11.91 ± 0.27 <sup>b</sup>
	0.321 ± 0.008 <sup>a</sup>	23.36 ± 0.80 <sup>a</sup>	37.73 ± 0.84 <sup>a</sup>	3.86 ± 0.46 <sup>a</sup>	234.88 ± 9.61 <sup>a</sup>	6.81 ± 0.64 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.05 <sup>b</sup>	88.48 ± 0.96 <sup>a</sup>	-1.92 ± 0.09 <sup>a</sup>	9.93 ± 0.23 <sup>b</sup>	12.39 ± 0.69 <sup>b</sup>
OH30	0.329 ± 0.012 <sup>a</sup>	22.47 ± 0.76 <sup>a</sup>	38.08 ± 1.21 <sup>a</sup>	2.25 ± 0.14 <sup>b</sup>	252.54 ± 10.82 <sup>a</sup>	3.17 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.79 ± 0.02 <sup>b</sup>	87.67 ± 0.27 <sup>a</sup>	-2.88 ± 0.04 <sup>b</sup>	13.53 ± 0.30 <sup>a</sup>	15.67 ± 0.39 <sup>a</sup>

\*WVP = g mm m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> kPa<sup>-1</sup>

Values are represented as mean ± standard deviation.

Different superscript letters in the same column indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

### 3.3.1 Film thickness

A wide range of FT values has been reported for biopolymer films in the literature, indicating its dependence on film composition and processing parameters (García et al., 2009a). As can be seen in **Table 3**, FT of the control film was 0.324 mm, and there were no statistical differences in FT values ( $p$ -value  $> 0.05$ ) between control and treated films. Similar results were obtained by Bae et al. (2009), when evaluating the effect of US on FT of fish gelatin/montmorillonite nanocomposite films. Coelho et al. (2017) also found non-significant differences in FT of chitosan and starch films produced by OH and US. The average FT is used to calculate film mechanical and barrier properties; therefore, it can be concluded that any difference obtained for these other properties are not due to thickness variation.

### 3.3.2 Moisture content and water solubility

MC is a parameter related to the total void volume occupied by water molecules in the network microstructure of the film, while WS is related to hydrophilicity (water affinity) of the materials (Jiang et al., 2010). Overall, film insolubility is desired to increase water resistance and ensure food product integrity. On the other hand, for food or additives encapsulation, high WS of edible films is required (Zavareze et al., 2012). The MC and WS values (**Table 3**) for all films were approximately 22% and 37%, respectively. These results are in agreement with

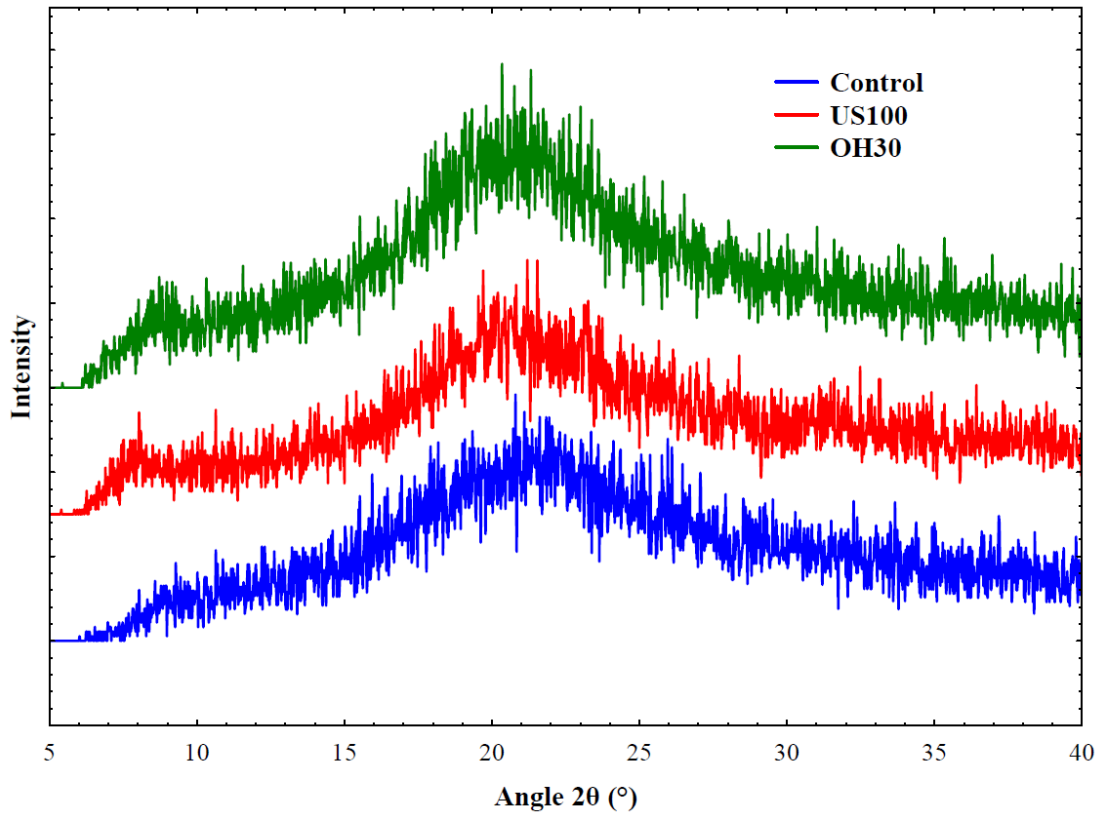
those obtained for gelatin-based films reported by Iahnke et al. (2015) (MC: 20.13 - 24.92%; WS: 31.64 - 43.39%) and Campo et al. (2017) (MC: 20.07 - 21.36%; WS: 37.68 - 46.23%).

Results from **Table 3** show that there were no significant differences ( $p$ -value  $> 0.05$ ) in MC and WS values between control, OH30, and US100 films. Similar results were obtained by Banerjee et al. (1996), who evaluated the effect of US on the properties of milk protein-based films. US did not modify the MC of sodium caseinate and whey protein concentrate films. Gul et al. (2018) also observed that the US treatment at different intensities (50% - 100 %) and times (2 - 6 min) slightly affected the WS of hazelnut protein films. Concerning OH application, Pereira et al. (2010) found non-significant differences in MC and WS values between control and ohmic heated whey protein films.

### 3.3.3 X-ray diffraction

Information regarding microstructure of film materials is critical since it determines their barrier and mechanical properties (García et al., 2009b). Therefore, X-ray diffraction (XRD) was used to investigate possible changes in microstructure of gelatin-based films due to OH and US treatments. **Figure 4** shows the diffraction peaks for control, OH30, and US100 films. As observed, all films presented a diffraction peak at  $2\theta = 20.62^\circ - 21.58^\circ$ , corresponding to random coiled conformation (amorphous fractions) of the gelatin macromolecules, as similarly reported by Liu et al. (2021). In addition, another less intense peak was observed at  $2\theta = 7.74^\circ - 9.02^\circ$ , corresponding to the triple-helical crystalline structures of gelatin (Ahammed et al., 2021; F. Liu et al., 2017).

The treated films showed higher intensity in the triple helix peak than the control film, which indicates higher levels of triple helix renaturation (Balau et al., 2004). Consequently, the crystallinity index (CI) of OH30 (49.07%) and US100 (43.44%) was higher than the control film (34.65%), suggesting that the treated films developed a more ordered structure. Similar results were found by García et al. (2009b) for electrically treated composite films based on chitosan and methylcellulose blends: X-ray diffraction analysis indicated that the treated film exhibited a more ordered structure. Moreover, a new peak was observed at  $2\theta = 15^\circ$ , which was attributed to the effect of the electric field on the charged chitosan polymer. Similarly, Souza et al. (2010) reported that chitosan film crystallinity increased gradually with the increase of the electric field strength. Regarding the US treatment, a tendency to increase crystallinity as exposure time increases was reported by Cheng et al. (2010) for starch-based films.



**Figure 4** - X-ray diffraction patterns of gelatin-based films produced by different technologies.

### 3.3.4 Thermogravimetric analysis

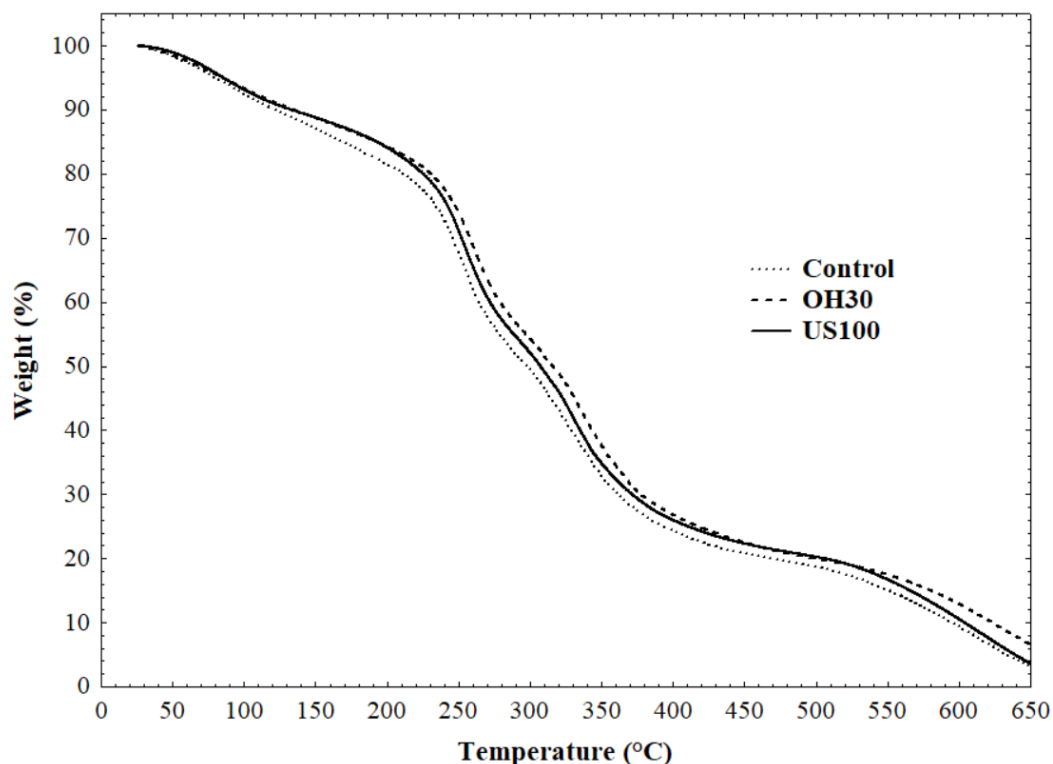
The thermogravimetric graphs for control, OH30, and US100 films are shown in **Figure 5**. Their thermal degradation temperature ( $T_{\text{donset}}$ ), weight loss ( $\Delta w$ ), and residues are presented in **Table 4**.

**Table 4** - Thermal degradation temperature ( $T_{\text{donset}}$ ), weight loss ( $\Delta w$ ), and residues for each stage of gelatin-based films produced by different technologies.

Film	$\Delta 1$		$\Delta 2$		$\Delta 3$		$\Delta 4$		Residues (%)
	$T_{\text{d1onset}}$ (°C)	$\Delta w_1$ (%)	$T_{\text{d2onset}}$ (°C)	$\Delta w_2$ (%)	$T_{\text{d3onset}}$ (°C)	$\Delta w_3$ (%)	$T_{\text{d4onset}}$ (°C)	$\Delta w_4$ (%)	
Control	133.34 <sup>a</sup>	11.76 <sup>a</sup>	217.59 <sup>b</sup>	20.94 <sup>a</sup>	292.78 <sup>c</sup>	39.40 <sup>a</sup>	531.54 <sup>b</sup>	32.60 <sup>a</sup>	3.08 <sup>b</sup>
OH30	135.71 <sup>a</sup>	10.94 <sup>a</sup>	228.78 <sup>a</sup>	21.16 <sup>a</sup>	317.01 <sup>a</sup>	39.66 <sup>a</sup>	543.73 <sup>a</sup>	33.28 <sup>a</sup>	6.56 <sup>a</sup>
US100	136.94 <sup>a</sup>	10.97 <sup>a</sup>	215.62 <sup>b</sup>	18.65 <sup>b</sup>	308.39 <sup>b</sup>	41.74 <sup>a</sup>	540.66 <sup>a</sup>	31.80 <sup>a</sup>	3.60 <sup>b</sup>

Each value represents the mean value of three determinations.

Different superscript letters in the same column indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).



**Figure 5** - Thermogravimetric graphs of gelatin-based films produced by different technologies.

**Figure 5** shows that all films presented the same behavior, with four main weight loss stages. The first stage of weight loss ( $\Delta w_1 = 10.94\% - 11.76\%$ ) was observed at the onset temperature ( $T_{d1}$ ) of  $133.34 - 136.94\text{ }^\circ\text{C}$  and is related to the loss of free and bound water adsorbed on the film surface (Peng et al., 2021). Similar results were found by Xiao et al. (2021), who developed composite gelatin and collagen films and reported the first weight loss below  $150\text{ }^\circ\text{C}$ . The second stage of weight loss ( $\Delta w_2 = 18.65\% - 21.16\%$ ) was observed at  $T_{d2}$  of  $215.62 - 217.59\text{ }^\circ\text{C}$  for control and US100; for sample OH30,  $T_{d2\text{onset}}$  showed a significant increase ( $228.78\text{ }^\circ\text{C}$ ). According to Ahmad et al. (2012), this stage corresponds to the degradation of low molecular weight protein fractions and glycerol present in the film matrix.

The third stage of degradation ( $\Delta w_3 = 39.40\% - 41.74\%$ ) was verified at the onset temperature ( $T_{d3}$ ) of  $292.78, 308.39$  and  $317.01\text{ }^\circ\text{C}$  for control, US100, and OH30, respectively. This may represent the decomposition of protein fractions of high molecular weight or highly interacted (Hoque et al., 2011). A fourth weight loss stage was observed above  $530\text{ }^\circ\text{C}$  for all samples. It might be associated with loss of thermally stable components of the film matrix and with chemical bonds rupture (Ahmad et al., 2015). Furthermore, all samples had mass residue ( $< 7\%$ ) at  $650\text{ }^\circ\text{C}$  due to carbon residue from film decomposition under air atmosphere. When nitrogen is used, more stable behavior and higher amounts of residual mass ( $18\% - 23\%$ ) are usually observed for gelatin-based films (Iahnke, Stoll, et al., 2019).

Overall, OH30 and US100 showed significantly higher  $T_{\text{donset}}$  than control film, especially in the third and fourth stages of degradation, suggesting that OH and US produced films with greater thermal stability. Comparing both treatments, OH showed more evident increase of thermal stability. This can be related to an increase in triple-helix structure and a higher degree of crystallinity (Boanini et al., 2010), which agrees with the previous X-ray diffraction results. According to Iahnke, Vargas, et al. (2019), higher degradation temperatures also indicates that more energy is required to degrade the film, associated with mechanical improvements.

### ***3.3.5 Mechanical properties***

Packaging materials must have the adequate mechanical strength to maintain their integrity during handling and storage; they also need to be flexible, being able to adapt itself to possible deformities without breaking (Wihodo & Moraru, 2013). TS, EAB, and YM values (**Table 3**) for the control film were 1.53 MPa, 244.27%, and 2.14 MPa, respectively. This results corroborates those obtained for gelatin residue-based films by Iahnke, Vargas, et al. (2019) (TS: 2.66 MPa; EAB: 235%; YM: 4.07 MPa) and Campo et al. (2017) (TS: 2.41 MPa; EAB: 265%). EAB was not affected by OH and US application, when compared to the control film. On the other hand, TS and YM values for OH30 and US100 were (p-value < 0.05) higher than control values. Moreover, between treatments, OH showed the most pronounced effect: OH30 had higher TS (3.86 MPa) and YM (6.81 MPa) values than US100 (TS: 2.25 MPa; YM: 3.17 MPa).

Previous studies have reported an increase in TS by the application of US on protein (Banerjee et al., 1996; Cruz-Diaz et al., 2019), polysaccharide (Cheng et al., 2010; Csiszar et al., 2016), and lipid composite films (Gul et al., 2018; Zhong et al., 2015). According to these authors, US is able to reduce particle size of protein chains, increasing the exposure of hydrophilic and hydrophobic groups. The increased amount of charged groups improves non-covalent bonds among protein molecules, enabling more interaction between water molecules and proteins. This leads to a more compact and rigid structure, with improved mechanical properties and greater thermal stability, corroborating the results obtained by TGA analysis. Sonication may also induce some conformational changes in gelatin, resulting in improved tensile properties (Santos et al., 2014).

The mechanical improvement observed due to OH application may be associated with a more ordered structure observed for OH30 film in the XRD analysis. The relationship between mechanical improvement and a higher degree of crystallinity for gelatin films has already been described by Panzavolta et al. (2014) and Bigi et al. (2004). According to Cervera et al. (2004),

the increase in crystallinity promotes intermolecular forces, increasing films rigidity. Souza et al. (2010) and García et al. (2009b) observed enhanced mechanical properties for chitosan films subjected to an electric field. The former found a significant increase in TS (increase of 9%) and EAB (increase of 18%) for films subjected to moderate electric field of  $100 \text{ V cm}^{-1}$ . The latter obtained more resistant films by applying the electric field during film drying. Iahnke, Vargas, et al. (2019) also reported a significant increase in TS and YM for gelatin-based films exposed to a moderate electric field of  $9.5 \text{ V cm}^{-1}$ . The effects obtained were associated with potential disturbances on tertiary protein structures probably caused by the alternating movement of electrical charges.

### ***3.3.6 Water vapor permeability***

Permeability is a steady-state property that describes the rate at which a permeating substance diffuses through a film; the driving force is the substance concentration gradient in both sides of the film (Souza et al., 2010). Since a primary function of an edible film or coating is to prevent moisture transfer between the food and the surrounding atmosphere, or between two components of a heterogeneous food product, WVP should be as low as possible (Gontard et al., 1992). WVP values (**Table 3**) for the gelatin-based films ranged from 0.75 to  $0.91 \text{ g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ , which is similar to that found by Avena-Bustillos et al. (2006) for cold-water fish gelatin films ( $0.93 \text{ g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ ). Compared to control, OH30, and US100 had lower WVP values ( $p\text{-value} < 0.05$ ), but without difference between both treatments.

The decrease in WVP due to US treatment was reported by Gul et al. (2018) for nano-emulsion films obtained from hazelnut meal protein and clove essential oil. Cheng et al. (2010) also observed WVP decrease when starch film-forming dispersions were sonificated. This effect can be explained by the collapse of cavitation bubbles, shear stresses, and formation of free radicals. According to Ahmadi et al. (2011), US may decompose film components (in this case, water and glycerol), leading to the formation of  $\text{H}\cdot$  and  $\text{OH}\cdot$  radicals.  $\text{H}\cdot$  radicals react with water vapor molecules by hydrogen bonds, promoting entrapment of the water molecules in the film network, which decreases WVP.

Regarding OH application, similar results were reported by Souza et al. (2009) and García et al. (2009b) for electrically treated chitosan films. According to these authors, the electric field applied can lead to the development of a more ordered structure, with a higher crystallinity index. Therefore, there is a decrease in WVP values since water vapor permeates through the amorphous zones. These results are in agreement with those obtained by the XRD analysis.



### 3.3.7 Color

Film color parameters are shown in **Table 3**. For the control film,  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  values were 89.14, -2.02 and 9.89, respectively. These results are in agreement with those found for gelatin-based films by Crizel et al. (2018) ( $L^*$ : 92.56,  $a^*$ : -0.99,  $b^*$ : 7.39) and Riahi et al. (2021) ( $L^*$ : 91.2,  $a^*$ : -0.6,  $b^*$ : 5.5). The visual appearance of the gelatin-based films is presented in **Figure 6**. All films showed a yellowish color (high values of parameter  $b^*$ ), associated to the color of the gelatinous residue used for film preparation.



**Figure 6** - Visual appearance of gelatin-based films produced by different technologies.

As observed in **Table 3** no significant differences in the color parameters were found between control and OH30 films. On the other hand, US100 film was more yellowish than the control (higher  $b^*$  value), which affects the  $\Delta E$  value. Wang et al. (2020) reported an opposite result for edible composite films based on rice protein hydrolysates and chitosan; the film treated at the highest US power had lower  $b^*$  value than the control film. However, the main visual changes caused by US application are related to the opacity, as discussed in the next section.

### 3.3.8 Light transmission and opacity

In most cases, an opaque package is desired to increase the light barrier and prevent food oxidation and degradation. On the other hand, gloss is an expected sensory characteristic of edible films for fruits and vegetables. Therefore, the relationship between opacity and gloss factors must be evaluated considering the film applicability to achieve a balance between food sensory and nutritional qualities (Silva-Weiss et al., 2013). **Table 5** shows the light

transmittance at selected wavelengths in the range of 200 - 800 nm, as well as the opacity values for control and treated gelatin-based films.

**Table 5** - Light transmission and opacity values of gelatin-based films produced by different technologies.

Film	Light transmission (%) at different wavelengths (nm)*									Opacity** (A mm <sup>-1</sup> )
	200	280	300	350	400	500	600	700	800	
<b>Control</b>	-0.07 <sup>a</sup>	-0.02 <sup>a</sup>	4.49 <sup>a</sup>	25.02 <sup>b</sup>	43.87 <sup>a</sup>	51.23 <sup>b</sup>	56.88 <sup>b</sup>	60.37 <sup>b</sup>	60.85 <sup>b</sup>	0.76 ± 0.05 <sup>a</sup>
<b>OH30</b>	0.00 <sup>a</sup>	0.01 <sup>a</sup>	3.20 <sup>a</sup>	23.60 <sup>b</sup>	42.58 <sup>a</sup>	52.46 <sup>b</sup>	58.63 <sup>b</sup>	61.12 <sup>b</sup>	63.45 <sup>b</sup>	0.72 ± 0.03 <sup>a</sup>
<b>US100</b>	-0.03 <sup>a</sup>	-0.02 <sup>a</sup>	6.14 <sup>a</sup>	29.74 <sup>a</sup>	44.23 <sup>a</sup>	68.06 <sup>a</sup>	72.98 <sup>a</sup>	77.45 <sup>a</sup>	81.88 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.04 <sup>b</sup>

\*Each value represents the mean value of three determinations.

\*\*Values are represented as mean ± standard deviation.

Different superscript letters in the same column indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

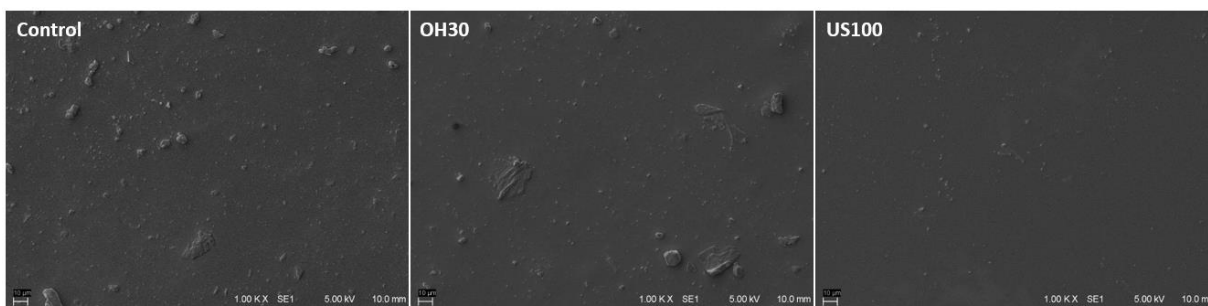
The light transmittance in the range between 200 and 300 nm was low for all samples, indicating that the gelatin-based films have excellent barrier properties against UV light. Higher UV light barrier capacity has already been reported for gelatin films by Ahmad et al. (2015) and Tongnuanchan et al. (2013), and it was attributed to the high concentration of aromatic amino acids present in the gelatinous solution, which can absorb UV radiation. OH application did not affect the transmission in the visible light range (350 - 800 nm) and the opacity values. On the other hand, US100 showed higher light transmittance and lower opacity (greater transparency) than control and OH30 films, which is supported by **Figure 6**. Similar results were obtained by Santos et al. (2014) for sonicated films based on fish gelatin and cellulose whiskers. US reduced the opacity of films regardless of cellulose whiskers concentration. Cheng et al. (2010) also observed a reduction in film opacity with different concentrations of corn starch. Film transparency is related with its internal structure, formed during drying process (Gul et al., 2018). Therefore, it depends on the degree of homogenization of the film-forming components. According to Petersson et al. (2009), US improves the dispersion of components in the film-forming solution, reducing light scattering.

### 3.3.9 Film surface characteristics

The SEM micrographs of control, OH30, and US100 films are illustrated in **Figure 7**. As can be seen, all films had a uniform and compact surface, without the presence of cracks or holes, which indicates the achievement of a homogeneous film matrix. Visually, there were no

huge differences between the control and the film produced by OH. Both films feature some larger “dots” randomly distributed on the surface. These dots may be associated with the high amount of glycerol in the gelatinous residue that was not fully solubilized in the film matrix. Liu et. al (2017) found similar results when studying the effect of glycerol and transglutaminase on gelatin film properties; films with higher amounts of glycerol showed rougher surface.

The film produced by US, on the other hand, had a more homogeneous and smooth surface, with a reduction in the size and number of dots. This shows that US was effective to homogenize the film-forming solution. This result impacts film opacity, corroborating the findings discussed in section 3.3.8. Similar results were found by Marcuzzo et al. (2010), who evaluated the effect of US on gluten-based film properties. The authors reported that a more homogeneous and transparent films were obtained, with a reduction in the number and size of protein aggregates as US exposure time increases. According to Gul et al. (2018), US promotes the homogeneous distribution of film components, improving barrier properties. Therefore, the microstructure of US100 film corroborates the results obtained for WVP analysis.



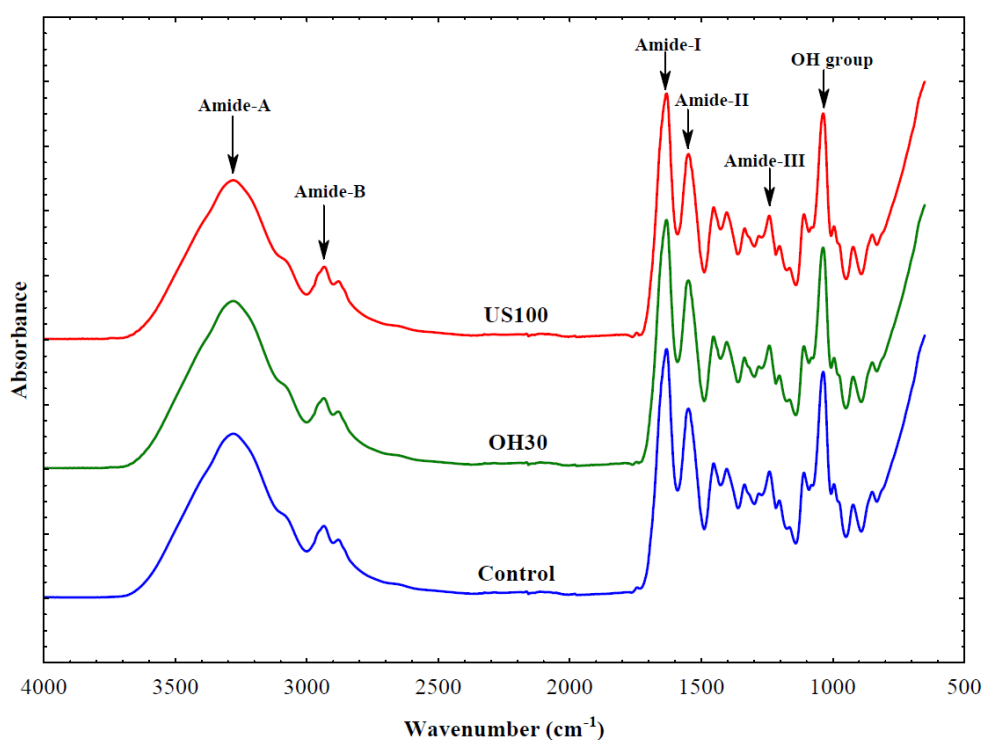
**Figure 7** - SEM microphotographs (at 1000 magnification) of gelatin-based films surfaces.

### ***3.3.10 Fourier transformation infrared***

The Fourier transformation infrared (FTIR) spectra of control, OH30, and US100 films are depicted in **Figure 8**. All gelatin-based samples showed similar spectral behavior and the same functional groups, which implies that the treatments did not cause structural changes at the molecular level. Three major peaks were found in the absorption region: amide-I ( $1631\text{-}1632\text{ cm}^{-1}$ ), amide-II ( $1547\text{-}1549\text{ cm}^{-1}$ ) and amide-III ( $1240\text{-}1241\text{ cm}^{-1}$ ). These bands are characteristic of raw gelatin from different sources (Iahnke, Stoll, et al., 2019). The amide-I absorption is primarily associated to a C=O stretching vibration coupled with the C–N stretch. The amide-II absorption is attributed to the combination of the N–H bending vibration and the C–N stretching vibration (Ahmad et al., 2012). Amide-III generally represents the C–N

stretching vibrations coupled to N–H in-bending vibrations with weak contributions from C–C stretching and C=O in-plane bending (Cebi et al., 2016).

An amide-A band was observed at 3279-3280  $\text{cm}^{-1}$ , and an amide-B band was found at 2934-2935  $\text{cm}^{-1}$ . The amide-A band corresponds to N–H stretching coupled with hydrogen bonding, and amide-B band represents the asymmetric stretch vibration of C–H and  $-\text{NH}_3^+$  of peptide fragments of gelatin molecules (Tongnuanchan et al., 2013). The intense absorption peak observed at 1036  $\text{cm}^{-1}$  is associated to symmetric stretching vibrations of OH groups of glycerol (Ahmad et al., 2015), which is a plasticizer intrinsic to the raw material used to produce the films. A similar FTIR spectrum was found by Nur Hanani et al. (2012), Cebi et al. (2016), and Hassan et al. (2021). These authors evaluated the differences among the FTIR spectra of gelatins obtained from different sources (bovine, porcine and fish). The results showed the same absorption peaks obtained in the present study, with small differences due to the type of gelatin.



**Figure 8** - Fourier transform infrared spectra of gelatin-based films produced by different technologies.

### 3.3.11 Indoor soil burial biodegradation

The biodegradability analysis was performed to reproduce the degradation conditions that occur in the natural soil environment. The soil is generally composed of microflora, which consists of bacteria, actinomycetes, fungi and protozoa, acting in synergy in the biodegradability process (Assis et al., 2017). The film biodegradability analysis was performed

every 4 days during 12 days. After this period, samples showed macroscopic deterioration and their recovery and evaluation was impracticable. Data of weight loss as a function of the soil burial exposure time for control, OH30, and US100 films are present in **Table 6**. As noted, there were no significant differences among films biodegradability.

**Table 6** - Weight loss as a function of the exposure time to soil burial for gelatin-based films produced by different technologies.

Film	Weight loss (%)			
	Day 0	Day 4	Day 8	Day 12
Control	0	20.28 ± 6.29 <sup>a</sup>	61.48 ± 5.47 <sup>a</sup>	93.93 ± 5.18 <sup>a</sup>
OH30	0	22.70 ± 5.58 <sup>a</sup>	60.46 ± 6.51 <sup>a</sup>	95.52 ± 4.08 <sup>a</sup>
US100	0	23.04 ± 4.37 <sup>a</sup>	58.92 ± 7.17 <sup>a</sup>	94.94 ± 4.65 <sup>a</sup>

Values are represented as mean ± standard deviation.

Different superscript letters in the same column indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

After 4 days of the incubation period, the gelatin-based films lost around 20% of their initial weight, which is associated with leaching out of low molecular weight components, such as glycerol. Glycerol may be absorbed by soil or pass through the microflora cell membrane, being metabolized by microbes (Martucci & Ruseckaite, 2009). On day 12, all samples lost more than 93% of their initial weight, which indicates their susceptibility to degrade under natural environmental conditions. Therefore, the gelatin-based films might be classified as rapidly degradable materials (Campo et al., 2017). Similar results were found by Martucci & Ruseckaite (2015), who observed complete degradation of gelatin films after 14 days. Dalev et al. (2001) also noted that chemically cross-linked gelatin films lost more than 95% of its initial weight on the sixth day of incubation.

#### 4 Conclusions

In this study, the potential use of ohmic heating and ultrasound to improve functional properties of biodegradable films made of gelatin capsule residues was evaluated. For ohmic heating, optimized mechanical properties were obtained with the lowest electric field strength (30 V) applied, regardless of the heating time. For ultrasound, the highest intensity (100%) and exposure time (20 min) promoted better mechanical properties.

Films produced by ohmic heating and ultrasound (compared to the control) presented a more ordered structure and a higher crystallinity index, which consequently improved their thermal stability, mechanical and barrier properties. Concerning mechanical improvements, the most pronounced effect was observed for the film produced by ohmic heating, that showed higher TS and YM values. Regarding optical properties, ultrasound decreased film opacity, resulting in a more transparent film with a smoother surface than the other films. Film thickness, moisture content, water solubility, and biodegradability were not affected by the applied treatments.

Overall, the results showed that ohmic heating and ultrasound are alternatives for developing biodegradable films. However, the improvements made so far with the application of emerging technologies are still not enough to compete with the synthetic plastics available on the market. In this regard, further studies are needed to better understand the impact of these technologies on film functional properties. Mastering the use of novel technologies in film development may be the key for tailoring films properties for specific applications

### **Acknowledgments**

This work was financially supported by CAPES (*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*), FAPERGS (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul*), and CNPq (*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*). The authors are grateful to the Chemical Pharmaceutical Tiaraju Laboratory, for supplying the raw material used in this study.

### **References**

- Ahammed, S., Liu, F., Wu, J., Khin, M. N., Yokoyama, W. H., & Zhong, F. (2021). Effect of transglutaminase crosslinking on solubility property and mechanical strength of gelatin-zein composite films. *Food Hydrocolloids*, 116. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106649>
- Ahmad, M., Benjakul, S., Prodpran, T., & Agustini, T. W. (2012). Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.12.003>
- Ahmad, M., Hani, N. M., Nirmal, N. P., Fазial, F. F., Mohtar, N. F., & Romli, S. R. (2015). Optical and thermo-mechanical properties of composite films based on fish gelatin/rice flour fabricated by casting technique. *Progress in Organic Coatings*, 84, 115–127. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2015.02.016>
- Ahmadi, E., Sareminezhad, S., & Azizi, M. H. (2011). The effect of ultrasound treatment on

- some properties of methylcellulose films. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1399–1401. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.08.015>
- Assis, R. Q., Lopes, S. M., Costa, T. M. H., Flôres, S. H., & Rios, A. de O. (2017). Active biodegradable cassava starch films incorporated lycopene nanocapsules. *Industrial Crops and Products*, 109, 818–827. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.043>
- Avena-Bustillos, R. J., Olsen, C. W., Olson, D. A., Chiou, B., Yee, E., Bechtel, P. J., & McHugh, T. H. (2006). Water vapor permeability of mammalian and fish gelatin films. *Journal of Food Science*, 71(4), 202–207. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00016.x>
- Bae, H. J., Park, H. J., Hong, S. I., Byun, Y. J., Darby, D. O., Kimmel, R. M., & Whiteside, W. S. (2009). Effect of clay content, homogenization RPM, pH, and ultrasonication on mechanical and barrier properties of fish gelatin/montmorillonite nanocomposite films. *LWT - Food Science and Technology*, 42(6), 1179–1186. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.12.016>
- Balau, L., Lisa, G., Popa, M. I., Tura, V., & Melnig, V. (2004). Physico-chemical properties of Chitosan films. *Central European Journal of Chemistry*, 2(4), 638–647. <https://doi.org/10.2478/BF02482727>
- Banerjee, R., Chen, H., & Wu, J. (1996). Milk protein-based edible film mechanical strength changes due to ultrasound process. *Journal of Food Science*, 61(4), 824–828. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb12211.x>
- Bigi, A., Panzavolta, S., & Rubini, K. (2004). Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, 25(25), 5675–5680. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.033>
- Boanini, E., Rubini, K., Panzavolta, S., & Bigi, A. (2010). Chemico-physical characterization of gelatin films modified with oxidized alginate. *Acta Biomaterialia*, 6(2), 383–388. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.06.015>
- Borah, P. P., Das, P., & Badwaik, L. S. (2017). Ultrasound treated potato peel and sweet lime pomace based biopolymer film development. *Ultrasonics Sonochemistry*, 36, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.11.010>
- Campo, C. de, Pagno, C. H., Costa, T. M. H., De Oliveira Rios, A., & Flôres, S. H. (2017). Gelatin capsule waste: New source of protein to develop a biodegradable film. *Polimeros*, 27(2), 100–107. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.2371>
- Cardoso, G. P., Dutra, M. P., Fontes, P. R., Ramos, A. de L. S., Gomide, L. A. de M., & Ramos, E. M. (2016). Selection of a chitosan gelatin-based edible coating for color preservation of beef in retail display. *Meat Science*, 114, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.12.012>
- Cebi, N., Durak, M. Z., Toker, O. S., Sagdic, O., & Arici, M. (2016). An evaluation of Fourier transforms infrared spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine, porcine and fish gelatins. *Food Chemistry*, 190, 1109–1115. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.065>
- Cervera, M. F., Heinämäki, J., Krogars, K., Jörgensen, A. C., Karjalainen, M., Colarte, A. I., & Yliruusi, J. (2004). Solid-state and mechanical properties of aqueous chitosan-amylose starch films plasticized with polyols. *AAPS PharmSciTech*, 5(1), 109–114. <https://doi.org/10.1208/pt050115>

- Cheng, W., Chen, J., Liu, D., Ye, X., & Ke, F. (2010). Impact of ultrasonic treatment on properties of starch film-forming dispersion and the resulting films. *Carbohydrate Polymers*, *81*(3), 707–711. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.03.043>
- Coelho, C. C. S., Cerqueira, M. A., Pereira, R. N., Pastrana, L. M., Freitas-Silva, O., Vicente, A. A., Cabral, L. M. C., & Teixeira, J. A. (2017). Effect of moderate electric fields in the properties of starch and chitosan films reinforced with microcrystalline cellulose. *Carbohydrate Polymers*, *174*, 1181–1191. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.007>
- Crizel, T. de M., de Oliveira Rios, A., Alves, V. D., Bandarra, N., Moldão-Martins, M., & Hickmann Flôres, S. (2018). Biodegradable Films Based on Gelatin and Papaya Peel Microparticles with Antioxidant Properties. *Food and Bioprocess Technology*, *11*(3), 536–550. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-2030-0>
- Cruz-Diaz, K., Cobos, Á., Fernández-Valle, M. E., Díaz, O., & Cambero, M. I. (2019). Characterization of edible films from whey proteins treated with heat, ultrasounds and/or transglutaminase. Application in cheese slices packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, *22*. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100397>
- Csiszar, E., Kalic, P., Kobol, A., & Ferreira, E. D. P. (2016). The effect of low frequency ultrasound on the production and properties of nanocrystalline cellulose suspensions and films. *Ultrasonics Sonochemistry*, *31*, 473–480. <https://doi.org/10.1016/j.ultrsonch.2016.01.028>
- Dalev, P., Staromanova, E., Dalev, D., Patil, R. D., Mark, J. E., Vassileva, E., & Fakirov, S. (2001). Biodegradation of chemically modified gelatin films in a simulated natural environment. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, *15*(2), 116–123. <https://doi.org/10.1080/13102818.2001.10819142>
- Dolatowski, Z. J., Stadnik, J., & Stasiak, D. (2007). Applications of ultrasound in food technology. *ACTA Scientiarum Polonorum*, *63*(6), 89–99. [https://www.researchgate.net/publication/46168522\\_Applications\\_of\\_ultrasound\\_in\\_food\\_technology](https://www.researchgate.net/publication/46168522_Applications_of_ultrasound_in_food_technology)
- Dubey, N. K., & Dubey, R. (2020). Edible films and coatings: An update on recent advances. In *Biopolymer-Based Formulations: Biomedical and Food Applications* (pp. 675–695). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816897-4.00027-8>
- Fabra, M. J., Martínez-Sanz, M., Gómez-Mascaraque, L. G., Coll-Marqués, J. M., Martínez, J. C., & López-Rubio, A. (2017). Development and characterization of hybrid corn starch-microalgae films: Effect of ultrasound pre-treatment on structural, barrier and mechanical performance. *Algal Research*, *28*, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.10.010>
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science and Technology*, *22*(6), 292–303. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.02.004>
- Feng, H., & Yang, W. (2006). Power Ultrasound. In Y. H. Hui & F. Sherkat (Eds.), *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering - Volume 4* (pp. 121-1-121–129). Taylor & Francis Group, LLC. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/b15995>
- García, M. A., Pinotti, A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2009a). Characterization of Starch and Composite Edible Films and Coatings. In M. E. Embuscado & K. C. Huber (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications* (pp. 169–209). Springer Science + Business Media, LLC. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_6)



- García, M. A., Pinotti, A., Martino, M., & Zaritzky, N. (2009b). Electrically treated composite FILMS based on chitosan and methylcellulose blends. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 722–728. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.06.008>
- Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., Gómez-Estaca, J., López-Caballero, E., Giménez, B., & Montero, P. (2009). Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science and Technology*, 20(1), 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.10.002>
- Gontard, N., Guilbert, S., & Cuq, J.-L. (1992). Edible Wheat Gluten Films: Influence of the Main Process Variables on Film Properties using Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*, 57(1), 190–195. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05453.x>
- Gul, O., Saricaoglu, F. T., Besir, A., Atalar, I., & Yazici, F. (2018). Effect of ultrasound treatment on the properties of nano-emulsion films obtained from hazelnut meal protein and clove essential oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 41, 466–474. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.10.011>
- Hassan, N., Ahmad, T., Zain, N. M., & Awang, S. R. (2021). Identification of bovine, porcine and fish gelatin signatures using chemometrics fuzzy graph method. *Scientific Reports*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89358-2>
- Hoque, M. S., Benjakul, S., Prodpran, T., & Songtipya, P. (2011). Properties of blend film based on cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin and mungbean protein isolate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(4), 663–673. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.06.028>
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., & Farahmandghavi, F. (2016). Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. *Food Chemistry*, 194, 1266–1274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.004>
- Iahnke, A. O. e. S., Costa, T. M. H., Rios, A. de O., & Flôres, S. H. (2015). Residues of minimally processed carrot and gelatin capsules: Potential materials for packaging films. *Industrial Crops and Products*, 76, 1071–1078. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.08.025>
- Iahnke, A. O. e. S., Stoll, L., Bellé, A. S., Hertz, P. F., Rios, A. de O., Rahier, H., & Flôres, S. H. (2019). Gelatin capsule residue-based films crosslinked with the natural agent genipin. *Packaging Technology and Science*, 33(1), 1–12. <https://doi.org/10.1002/pts.2481>
- Iahnke, A. O. e. S., Vargas, C. G., Mercali, G. D., Rios, A. de O., Rahier, H., & Flôres, S. H. (2019). Effect of moderate electricfield on the properties of gelatin capsule residue-based films. *Food Hydrocolloids*, 89, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.015>
- Ibarguren, C., Céliz, G., Díaz, A. S., Bertuzzi, M. A., Daz, M., & Audisio, M. C. (2015). Gelatine based films added with bacteriocins and a flavonoid ester active against food-borne pathogens. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 28, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.01.007>
- Jeevahan, J., Chandrasekaran, M., Venkatesan, S. P., Sriram, V., Britto, J. G., Mageshwaran, G., & Durairaj, R. B. (2020). Scaling up difficulties and commercial aspects of edible films for food packaging: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 100, 210–222. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.014>
- Jiang, Y., Li, Y., Chai, Z., & Leng, X. (2010). Study of the physical properties of whey protein isolate and gelatin composite films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8),

- 5100–5108. <https://doi.org/10.1021/jf9040904>
- Kadam, D. M., Thunga, M., Wang, S., Kessler, M. R., Grewell, D., Lamsal, B., & Yu, C. (2013). Preparation and characterization of whey protein isolate films reinforced with porous silica coated titania nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, *117*(1), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.046>
- Kadam, S. U., Pankaj, S. K., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., & O'Donnell, C. P. (2015). Development of biopolymer-based gelatin and casein films incorporating brown seaweed *Ascophyllum nodosum* extract. *Food Packaging and Shelf Life*, *6*, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2015.09.003>
- Kang, H. J., & Min, S. C. (2010). Potato peel-based biopolymer film development using high-pressure homogenization, irradiation, and ultrasound. *LWT - Food Science and Technology*, *43*(6), 903–909. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.025>
- Kowalczyk, D., & Biendl, M. (2016). Physicochemical and antioxidant properties of biopolymer/candelilla wax emulsion films containing hop extract - A comparative study. *Food Hydrocolloids*, *60*, 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.010>
- Leadley, C. E., & Williams, A. (2006). Pulsed Electric Field Processing, Power Ultrasound and Other Emerging Technologies. In J. G. Brennan (Ed.), *Food Processing Handbook* (pp. 201–235). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/3527607579.ch7>
- Lei, L., Zhi, H., Xiujin, Z., Takasuke, I., & Zaigui, L. (2007). Effects of different heating methods on the production of protein-lipid film. *Journal of Food Engineering*, *82*(3), 292–297. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.02.030>
- Liu, C. C., Tellez-Garay, A. M., & Castell-Perez, M. E. (2004). Physical and mechanical properties of peanut protein films. *LWT - Food Science and Technology*, *37*(7), 731–738. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.02.012>
- Liu, F., Chiou, B. Sen, Avena-Bustillos, R. J., Zhang, Y., Li, Y., McHugh, T. H., & Zhong, F. (2017). Study of combined effects of glycerol and transglutaminase on properties of gelatin films. *Food Hydrocolloids*, *65*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.004>
- Liu, J., Zhang, L., Liu, C., Zheng, X., & Tang, K. (2021). Tuning structure and properties of gelatin edible films through pullulan dialdehyde crosslinking. *LWT - Food Science and Technology*, *138*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110607>
- Luo, Q., Hossen, M. A., Zeng, Y., Dai, J., Li, S., Qin, W., & Liu, Y. (2022). Gelatin-based composite films and their application in food packaging: A review. *Journal of Food Engineering*, *313*. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110762>
- Marcuzzo, E., Peressini, D., Debeaufort, F., & Sensidoni, A. (2010). Effect of ultrasound treatment on properties of gluten-based film. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *11*(3), 451–457. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.03.002>
- Martucci, J. F., & Ruseckaite, R. A. (2009). Biodegradation of three-layer laminate films based on gelatin under indoor soil conditions. *Polymer Degradation and Stability*, *94*(8), 1307–1313. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.03.018>
- Martucci, J. F., & Ruseckaite, R. A. (2015). Biodegradation behavior of three-layer sheets based on gelatin and poly (lactic acid) buried under indoor soil conditions. *Polymer Degradation and Stability*, *116*, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2015.03.005>
- Mercali, G. D., Jaeschke, D. P., Tessaro, I. C., & Marczak, L. D. F. (2012). Study of vitamin C

- degradation in acerola pulp during ohmic and conventional heat treatment. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.030>
- Nur Hanani, Z. A., Roos, Y. H., & Kerry, J. P. (2012). Use of beef, pork and fish gelatin sources in the manufacture of films and assessment of their composition and mechanical properties. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.01.015>
- O'Donnell, C. P., Tiwari, B. K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2010). Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7), 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.007>
- Ojagh, S. M., Núñez-Flores, R., López-Caballero, M. E., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2011). Lessening of high-pressure-induced changes in Atlantic salmon muscle by the combined use of a fish gelatin-lignin film. *Food Chemistry*, 125(2), 595–606. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.072>
- Pagno, C. H., Costa, T. M. H., De Menezes, E. W., Benvenuti, E. V., Hertz, P. F., Matte, C. R., Tosati, J. V., Monteiro, A. R., Rios, A. O., & Flôres, S. H. (2015). Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 173, 755–762. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.068>
- Panzavolta, S., Gioffrè, M., Bracci, B., Rubini, K., & Bigi, A. (2014). Montmorillonite reinforced type A gelatin nanocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(11), 1–6. <https://doi.org/10.1002/app.40301>
- Park, J., Nam, J., Yun, H., Jin, H. J., & Kwak, H. W. (2021). Aquatic polymer-based edible films of fish gelatin crosslinked with alginate dialdehyde having enhanced physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 254. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117317>
- Pelissari, F. M., Andrade-Mahecha, M. M., Sobral, P. J. do A., & Menegalli, F. C. (2013). Comparative study on the properties of flour and starch films of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). *Food Hydrocolloids*, 30(2), 681–690. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.08.007>
- Peña-Rodríguez, C., Martucci, J. F., Neira, L. M., Arbelaiz, A., Eceiza, A., & Ruseckaite, R. A. (2015). Functional properties and in vitro antioxidant and antibacterial effectiveness of pigskin gelatin films incorporated with hydrolysable chestnut tannin. *Food Science and Technology International*, 21(3), 221–231. <https://doi.org/10.1177/1082013214525429>
- Peng, L., Wang, H., Dai, H., Fu, Y., Ma, L., Zhu, H., Yu, Y., Li, L., Wang, Q., & Zhang, Y. (2021). Preparation and characterization of gelatin films by transglutaminase cross-linking combined with ethanol precipitation or Hofmeister effect. *Food Hydrocolloids*, 113(2). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106421>
- Pereira, R. N., Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). Effects of electric fields on protein unfolding and aggregation: Influence on edible films formation. *Biomacromolecules*, 11(11), 2912–2918. <https://doi.org/10.1021/bm100681a>
- Petersson, L., Mathew, A. P., & Oksman, K. (2009). Dispersion and Properties of Cellulose Nanowhiskers and Layered Silicates in Cellulose Acetate Butyrate Nanocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*, 112(5), 2001–2009. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/app.29661>

- Ramos, M., Valdés, A., Beltrán, A., & Garrigós, M. (2016). Gelatin-Based Films and Coatings for Food Packaging Applications. *Coatings*, 6(4), 41. <https://doi.org/10.3390/coatings6040041>
- Riahi, Z., Priyadarshi, R., Rhim, J. W., & Bagheri, R. (2021). Gelatin-based functional films integrated with grapefruit seed extract and TiO<sub>2</sub> for active food packaging applications. *Food Hydrocolloids*, 112. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106314>
- Rodriguez-Turienzo, L., Cobos, A., & Diaz, O. (2012). Effects of edible coatings based on ultrasound-treated whey proteins in quality attributes of frozen Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 14, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.12.003>
- Rotta, J., Ozório, R. Á., Kehrwald, A. M., de Oliveira Barra, G. M., de Melo Castanho Amboni, R. D., & Barreto, P. L. M. (2009). Parameters of color, transparency, water solubility, wettability and surface free energy of chitosan/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. *Materials Science and Engineering C*, 29(2), 619–623. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.10.032>
- Santos, T. M., Filho, M. de S. M. S., Caceres, C. A., Rosa, M. F., Morais, J. P. S., Pinto, A. M. B., & Azeredo, H. M. C. (2014). Fish gelatin films as affected by cellulose whiskers and sonication. *Food Hydrocolloids*, 41, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.001>
- Sastry, S. (2008). Ohmic heating and moderate electric field processing. *Food Science and Technology International*, 14(5), 419–422. <https://doi.org/10.1177/1082013208098813>
- Sastry, S. K., & Barach, J. T. (2000). Ohmic and Inductive Heating. *Journal of Food Science*, 65, 42–46. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2000.tb00617.x>
- Shankar, S., Jaiswal, L., & Rhim, J. W. (2016). Gelatin-Based Nanocomposite Films: Potential Use in Antimicrobial Active Packaging. In *Antimicrobial Food Packaging*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00027-9>
- Silva-Weiss, A., Ihl, M., Sobral, P. J. A., Gómez-Guillén, M. C., & Bifani, V. (2013). Natural Additives in Bioactive Edible Films and Coatings: Functionality and Applications in Foods. *Food Engineering Reviews*, 5(4), 200–216. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9072-5>
- Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Casariego, A., Lima, A. M. P., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2009). Effect of moderate electric fields in the permeation properties of chitosan coatings. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2110–2115. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.03.021>
- Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Martins, J. T., Casariego, A., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). Influence of electric fields on the structure of chitosan edible coatings. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 330–335. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.011>
- Tinoco, A., Rodrigues, R. M., Machado, R., Pereira, R. N., Cavaco-Paulo, A., & Ribeiro, A. (2020). Ohmic heating as an innovative approach for the production of keratin films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 671–680. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.122>
- Tongnuanchan, P., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2013). Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils. *Journal of Food Engineering*, 117(3), 350–360.

- <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.03.005>
- Tyburcy, A., & Kozyra, D. (2010). Effects of composite surface coating and pre-drying on the properties of kabanosy dry sausage. *Meat Science*, 86(2), 405–410. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.025>
- Vera, A., Tapia, C., & Abugoch, L. (2020). Effect of high-intensity ultrasound treatment in combination with transglutaminase and nanoparticles on structural, mechanical, and physicochemical properties of quinoa proteins/chitosan edible films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 536–543. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.120>
- Wang, L., Ding, J., Fang, Y., Pan, X., Fan, F., Li, P., & Hu, Q. (2020). Effect of ultrasonic power on properties of edible composite films based on rice protein hydrolysates and chitosan. *Ultrasonics Sonochemistry*, 65. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105049>
- Wang, L., Dong, Y., Men, H., Tong, J., & Zhou, J. (2013). Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.034>
- Wihodo, M., & Moraru, C. I. (2013). Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: A review. *Journal of Food Engineering*, 114(3), 292–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.08.021>
- Wu, Y., Weller, C. L., Hamouz, F., Cuppett, S. L., & Schnepf, M. (2002). Development and application of multicomponent edible coatings and films: A review. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 44, pp. 347–394). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(02\)44007-7](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(02)44007-7)
- Xiao, J., Ma, Y., Wang, W., Zhang, K., Tian, X., Zhao, K., Duan, S., Li, S., & Guo, Y. (2021). Incorporation of gelatin improves toughness of collagen films with a homo-hierarchical structure. *Food Chemistry*, 345. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128802>
- Zavareze, E. D. R., Pinto, V. Z., Klein, B., El Halal, S. L. M., Elias, M. C., Prentice-Hernández, C., & Dias, A. R. G. (2012). Development of oxidised and heat-moisture treated potato starch film. *Food Chemistry*, 132(1), 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.090>
- Zhong, T., Huang, R., Sui, S., Lian, Z., Sun, X., & Wan, A. (2015). Effects of ultrasound treatment on lipid self-association and properties of methylcellulose/stearic acid blending films. *Carbohydrate Polymers*, 131, 415–423. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.026>

## Capítulo 6 - Discussão geral e conclusões

As embalagens alimentícias desempenham um papel muito importante para a proteção e armazenamento de alimentos e matérias-primas. As embalagens tradicionais são normalmente produzidas a partir de polímeros sintéticos derivados do petróleo. Apesar de apresentarem ótimas propriedades mecânicas, térmicas e de barreira, esses materiais possuem natureza não-renovável e não-biodegradável, o que gera uma série de problemas ambientais relacionados ao acúmulo de seus resíduos. Dessa forma, há um crescente interesse para o desenvolvimento de materiais renováveis e/ou biodegradáveis. Nesse contexto, filmes biodegradáveis, desenvolvidos a partir de biopolímeros, representam uma alternativa bastante promissora para substituir ou minimizar o uso de plásticos convencionais.

Dentre os biopolímeros, a gelatina tem sido amplamente estudada devido às suas características particulares, como capacidade de formação de filme, aceitabilidade sensorial, além de bons atributos ópticos. Entretanto, quando comparada aos polímeros sintéticos, a gelatina apresenta menor resistência mecânica, além de alta sensibilidade à umidade, o que afeta suas propriedades de barreira e limita sua aplicação. Dessa forma, várias estratégias têm sido seguidas para modificar suas propriedades, destacando-se o uso de tratamentos físicos, que incluem a aplicação de tecnologias emergentes. O presente estudo teve como objetivo desenvolver filmes biodegradáveis a partir de resíduos gelatinosos e investigar os efeitos de diferentes técnicas em suas propriedades e estrutura. A partir dos resultados obtidos, foram produzidos dois artigos científicos.

O primeiro artigo intitulado “*Effect of ohmic heating and ultrasound on functional properties of biodegradable gelatin-based films*” teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes parâmetros do aquecimento ôhmico (intensidade de campo elétrico e tempo) e do ultrassom (intensidade e tempo) nas propriedades e estrutura dos filmes. Já o segundo artigo intitulado “*Morphology and functional properties of gelatin-based films modified by UV radiation and bacterial cellulose nanofibers*” teve como objetivo modificar as propriedades dos filmes de gelatina através da aplicação de radiação UV e da incorporação de nanofibras de celulose bacteriana. Para melhor avaliação dos resultados promovidos pelas diferentes técnicas, na Tabela 3 estão resumidos os principais efeitos verificados nas propriedades dos filmes.

**Tabela 3** - Efeitos das diferentes técnicas nas propriedades dos filmes à base de gelatina.

<b>Propriedades</b>	<b>Aquecimento ôhmico</b>	<b>Ultrassom</b>	<b>Radiação ultravioleta</b>	<b>Nanofibras de celulose bacteriana</b>
Físico-químicas	Não afetou a espessura, umidade e solubilidade em água	Não afetou a espessura, umidade e solubilidade em água	Redução da solubilidade em água, sem efeito na espessura e umidade	Redução da solubilidade em água, sem efeito na espessura e umidade
De barreira	Redução da PVA	Redução da PVA	Não afetou a PVA	Redução da PVA
Mecânicas	Aumento da RT e MY, sem efeito na elongação	Aumento da RT e MY, sem efeito na elongação	Aumento da RT e MY, redução da elongação	Redução da elongação, sem efeito na RT e MY
Ópticas	Filmes amarelados e transparentes (sem efeito na cor e opacidade)	Filmes amarelados e transparentes (diminuição da opacidade)	Filmes amarelados e transparentes (sem efeito na cor e opacidade)	Filmes amarelados e transparentes (aumento da opacidade)
Estruturais e Morfológicas (DRX)	Desenvolvimento de uma estrutura mais ordenada, com maior índice de cristalinidade	Desenvolvimento de uma estrutura mais ordenada, com maior índice de cristalinidade	N.A	N.A
Estruturais e Morfológicas (MEV)	Matrix coesa e superfície homogênea	Matrix coesa e superfície homogênea	Matrix coesa e superfície homogênea	Matrix coesa e superfície homogênea (presença de alguns aglomerados)
Térmicas	Aumento da estabilidade térmica (maiores temperaturas de degradação)	Aumento da estabilidade térmica (maiores temperaturas de degradação)	Aumento da estabilidade térmica (maiores temperaturas de degradação)	N.A
Biodegradabilidade	Perda da integridade em 12 dias	Perda da integridade em 12 dias	Perda da integridade em 12 dias	Perda da integridade em 12 dias

N.A: não aplicável.

RT: resistência à tração; MY: Módulo de Young; PVA: permeabilidade ao vapor d'água.

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que nenhum tratamento afetou a espessura e umidade dos filmes, já a solubilidade foi significativamente reduzida pela aplicação de radiação UV e pela incorporação das nanofibras. A solubilidade é uma importante propriedade

relacionada com a afinidade do filme com a água. Na maioria dos casos, deseja-se uma embalagem insolúvel, para manter a integridade do alimento. Em relação as propriedades de barreira, verificou-se que todas as técnicas, com exceção da radiação UV, reduziram significativamente a permeabilidade ao vapor d'água (PVA), com efeitos mais pronunciados para o filme reforçado com nanofibras (redução de 43% em relação ao filme controle). Assim como a solubilidade, a PVA também avalia a interação do filme com a água, neste caso, a transferência do vapor d'água entre o alimento e o ambiente externo; portanto, deseja-se que a PVA seja a menor possível. Nesse contexto, as técnicas empregadas foram promissoras para o aprimoramento dessa propriedade.

Em relação às propriedades mecânicas, normalmente, deseja-se filmes que apresentem alta resistência e elasticidade moderada, de forma que o filme seja capaz de se deformar sem se romper. O aprimoramento mecânico dos filmes foi obtido pela aplicação de três técnicas, sendo elas o aquecimento ôhmico, o ultrassom e a radiação UV. Os efeitos mais pronunciados foram obtidos para os filmes tratados por aquecimento ôhmico, em que se verificou aumentos de até 152% na resistência à tração (RT) e de 218% no módulo de Young (MY). Esses efeitos são principalmente atribuídos ao aumento das ligações intermoleculares entre as cadeias proteicas e de mudanças conformacionais da gelatina. A radiação UV também afetou a elongação dos filmes, havendo redução significativa dessa propriedade. Esse resultado pode estar relacionado com o aumento da rigidez e diminuição da mobilidade das cadeias proteicas devido às reações de reticulação induzidas pelo UV.

Todos os filmes produzidos, independente da tecnologia empregada, apresentaram coloração amarelada, alta transparência e barreira à luz UV. De forma geral, os tratamentos não afetaram a coloração dos filmes. No caso da aplicação do ultrassom, verificou-se a obtenção de um filme mais transparente que os demais. Já na incorporação das nanofibras, verificou-se um ligeiro aumento da opacidade. Os parâmetros ópticos são de extrema importância para a aceitabilidade sensorial do filme como embalagem alimentícia. Normalmente, deseja-se embalagens que protejam o alimento dos efeitos da luz UV/visível; ao mesmo tempo, a transparência é uma característica desejada para melhor visualização do produto.

Pelos dados do DRX, verificou-se que os filmes tratados por ultrassom e aquecimento ôhmico apresentaram o desenvolvimento de uma estrutura mais ordenada, com maior índice de cristalinidade. Este efeito pode ser relacionado com o aprimoramento mecânico observado para esses filmes. Em relação às propriedades térmicas, todos os filmes analisados apresentaram o mesmo perfil de degradação, com quatro estágios principais de perda de massa. Quando comparadas ao filme controle, as amostras tratadas por aquecimento ôhmico, ultrassom e



radiação UV apresentaram maiores temperaturas de degradação em alguns estágios, indicando aumento da estabilidade térmica.

A análise por MEV permitiu visualizar a ausência de trincas e rachaduras nas superfícies das amostras, indicando o desenvolvimento de uma matriz coesa. De forma geral, todos os filmes apresentaram superfície homogênea, com presença de alguns pequenos aglomerados, associados ao glicerol. O filme incorporado com nanofibras apresentou alguns aglomerados adicionais, que podem ser atribuídos à celulose bacteriana, que não foi completamente solubilizada na solução. Já o filme tratado por ultrassom apresentou superfície mais lisa em comparação aos demais filmes, efeito atribuído ao alto poder de homogeneização dessa tecnologia. Portanto, o ultrassom pode ser empregado como uma estratégia para romper aglomerados de filmes compósitos, melhorando a dispersão dos biopolímeros na solução filmogênica, obtendo-se, conseqüentemente, filmes mais homogêneos e transparentes.

A principal propriedade característica dos filmes desenvolvidos nesse estudo é a biodegradabilidade. Os filmes foram submetidos à incubação no solo por um período de 12 dias e todas as amostras, independente do tratamento, perderam sua integridade (perda de mais de 90% de sua massa inicial) após o período avaliado. Dessa forma, os filmes à base de gelatina desenvolvidos podem ser classificados como rapidamente biodegradáveis, indicando que são suscetíveis à ação dos microrganismos disponíveis naturalmente no solo. Esse é o principal diferencial de um filme à base de biopolímeros em comparação às embalagens tradicionais, que podem levar centenas de anos para sua completa degradação.

De uma forma geral, verificou-se que a partir de resíduos gelatinosos, foi possível obter filmes biodegradáveis com propriedades funcionais. Todas as tecnologias empregadas apresentaram efeitos promissores nas propriedades dos filmes, com destaque para o aquecimento ôhmico, em que se obteve os maiores ganhos mecânicos, boas propriedades estruturais, térmicas, ópticas e de barreira. Entretanto, as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes de gelatina aprimorados (RT: 3,86 MPa; PVA: 0,75 g mm m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> kPa<sup>-1</sup>) são ainda inferiores às de um polímero sintético como o polietileno, por exemplo (RT: 18,42 MPa; PVA: 0,01 g mm m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> kPa<sup>-1</sup>) (ASSIS *et al.*, 2017). Portanto, mais estudos ainda precisam ser realizados com o intuito de ampliar as modificações desses filmes, tornando-os mais competitivos a nível industrial.

## Capítulo 7 - Perspectivas para trabalhos futuros

Com base nos resultados obtidos, é possível elencar as seguintes perspectivas para trabalhos futuros:

- uso conjunto das tecnologias avaliadas nesse estudo, com o objetivo de combinar as vantagens oferecidas por cada técnica, além da possível verificação de efeitos sinérgicos;
- aplicar as mesmas tecnologias em filmes à base de outros biopolímeros, como amido ou quitosana, com o objetivo de melhor compreender seus efeitos e mecanismos de ação em diferentes macromoléculas;
- avaliar a aplicação dos filmes desenvolvidos como embalagens alimentícias, levando em consideração as propriedades atuais obtidas. As propriedades atuais permitem a aplicação em alimentos com baixa umidade e/ou oleosos.

## Referências Bibliográficas

AHMED, J.; GULTEKINOGLU, M.; EDIRISINGHE, M. Bacterial cellulose micro-nano fibres for wound healing applications. **Biotechnology Advances**, v. 41, n. February, p. 107549, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107549>

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of analysis of **AOAC International**. 18. ed. Washington: AOAC, 2005.

ASHOKKUMAR, M.; BHASKARACHARYA, R.; KENTISH, S.; LEE, J.; PALMER, M.; ZISU, B. The ultrasonic processing of dairy products - An overview. **Dairy Science and Technology**, v. 90, n. 2–3, p. 147–168, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/dst/2009044>

ASHWIN, K.; KARTHICK, K.; ARUMUGAM, K. P. Biodegradable Polymers and Its Applications. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 1, n. 3, p. 173–176, 2011.

ASSIS, R. Q.; LOPES, S. M.; COSTA, T. M. H.; FLÔRES, S. H.; RIOS, A. de O. Active biodegradable cassava starch films incorporated lycopene nanocapsules. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 818–827, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.043>

ASTM D5338-15. Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials Under Controlled Composting Conditions, Incorporating Thermophilic Temperatures. **ASTM International**, West Conshohocken, 2015.

ASTM D882-09. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. **ASTM International**, West Conshohocken, 2009.

ASTM E96/E96M-16. Standard test methods for water vapor transmission of materials. **ASTM International**, West Conshohocken, 2016.

AZEREDO, H. M. C.; BARUD, H.; FARINAS, C. S.; VASCONCELLOS, V. M.; CLARO, A. M. Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 3, n. February, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00007>

BACH, Q. V.; CHEN, W. H. Pyrolysis characteristics and kinetics of microalgae via thermogravimetric analysis (TGA): A state-of-the-art review. **Bioresource Technology**, v. 246, p. 88–100, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.087>

BARUD, H. S.; GUTIERREZ, J.; LUSTRI, W. R.; PERES, M. F. S.; RIBEIRO, S. J. L.; SASKA, S.; TERCJAK, A. Bacterial Cellulose. *In*: NEVES, N. M.; REIS, R. L. (eds.). **Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies**. 1. ed. John Wiley & Sons, Inc. Published, 2016. p. 384–399. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781119126218>

BERTAN, L. C. Desenvolvimento e caracterização de biofilmes ativos à base de polímeros de fontes renováveis e sua aplicação no acondicionamento de pães de forma. **Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), 2008.

BHAT, R.; KARIM, A. A. Ultraviolet irradiation improves gel strength of fish gelatin. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1160–1164, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.039>

BILLINGHAM, N. C.; BONORA, M.; DE CORTE, D. Environmentally Degradable Plastics Based on Oxo-Biodegradation of Conventional Polyolefins. *In*: CHIPELLINI, E.; SOLARO, R. (eds.). **Biodegradable Polymers and Plastics**. Springer Science + Business Media, 2003. p. 313–325. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9240-6\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9240-6_21)

BONA, J. C. Preparação e Caracterização de Filmes Biodegradáveis a partir de Blendas de Amido com Polietileno. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (SC), 2007.

BORAH, P. P.; DAS, P.; BADWAIK, L. S. Ultrasound treated potato peel and sweet lime pomace based biopolymer film development. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 36, p. 11–19, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.11.010>

BROWN, A. J. An acetic ferment which forms cellulose. **Journal of the Chemical Society Transactions**, v. 49, p. 432–439, 1886.

CAMPO, C. de; PAGNO, C. H.; COSTA, T. M. H.; DE OLIVEIRA RIOS, A.; FLÔRES, S. H. Gelatin capsule waste: New source of protein to develop a biodegradable film. **Polimeros**, v. 27, n. 2, p. 100–107, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0104-1428.2371>

CANEVAROLO JR, S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. 1 ed. São Paulo: Artliber Editora, 2003.

CARISSIMI, M. Desenvolvimento e aplicação de filmes biodegradáveis a partir de amido de mandioca e microalga verde. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS), 2017.

CAZÓN, P.; VÁZQUEZ, M. Bacterial cellulose as a biodegradable food packaging material: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 113, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106530>

CHANG, S. T.; CHEN, L. C.; LIN, S. Bin; CHEN, H. H. Nano-biomaterials application: Morphology and physical properties of bacterial cellulose/gelatin composites via crosslinking. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 137–144, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.08.004>

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813–835, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>

CHEN, H.; WANG, J.; CHENG, Y.; WANG, C.; LIU, H.; BIAN, H.; PAN, Y.; SUN, J.; HAN, W. Application of protein-based films and coatings for food packaging: A review. **Polymers**, v. 11, n. 12, p. 1–32, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym11122039>

CHENG, K. C.; CATCHMARK, J. M.; DEMIRCI, A. Effect of different additives on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and analysis of material property. **Cellulose**, v. 16, n. 6, p. 1033–1045, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9346-5>

CHIULAN, I.; FRONE, A. N.; PANAITESCU, D. M.; NICOLAE, C. A.; TRUSCA, R. Surface properties, thermal, and mechanical characteristics of poly(vinyl alcohol)–starch–bacterial cellulose composite films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 6, p. 1–8, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/app.45800>

COBB, G. R.; O'HARA, R. P.; KEMNITZ, R. A.; SABELKIN, V. P.; DOANE, B. M. Quantifying the effects of ultraviolet type C radiation on the mechanical and electrical properties of carbon nanotube sheet for space-based applications. **Materials Today Communications**, v. 18, p. 7–13, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2018.10.016>

COCHRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental Designs**. 2. ed, 1992. Disponível em: <https://www.wiley.com/en-us/Experimental+Designs%2C+2nd+Edition-p-9780471545675>

CRUZ-DIAZ, K.; COBOS, Á.; FERNÁNDEZ-VALLE, M. E.; DÍAZ, O.; CAMBERO, M. I. Characterization of edible films from whey proteins treated with heat, ultrasounds and/or transglutaminase. Application in cheese slices packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 22, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100397>

CULLEN, P. J.; TIWARI, B. K.; VALDRAMIDIS, V. P. Status and Trends of Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods. *In: Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*. Elsevier Inc., 2012. p. 1–6. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381470-8.00001-3>

DANGARAN, K.; TOMASULA, P. M.; QI, P. Structure and function of protein-based edible films and coatings. *In: EMBUSCADO, M. E.; HUBER, K. C. (eds.). Edible Films and Coatings for Food Applications*. Springer Science + Business Media, LLC, 2009. p. 25–56. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_2)

DIAS, A. B. Desenvolvimento e Caracterização de Filmes Biodegradáveis obtidos de Amido e de Farinha de Arroz. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (SC), 2008.

DÍAZ, O.; CANDIA, D.; COBOS, Á. Effects of ultraviolet radiation on properties of films from whey protein concentrate treated before or after film formation. **Food Hydrocolloids**, v. 55, p. 189–199, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.11.019>

DJABOUROV, M.; LECHAIRE, J.-P.; GAILL, F. Structure and rheology of gelatin gels. **Biorheology**, v. 30, n. 3–4, p. 191–205, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/bir-1993-303-405>

ETXABIDE, A.; URANGA, J.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Development of active gelatin films by means of valorisation of food processing waste: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 192–198, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.021>

EUROPEAN BIOPLASTICS. “What are bioplastics? Material types, terminology, and labels – an introduction” Jan. 2016. Disponível em: <<https://www.european-bioplastics.org/bioplastics/>>. Acesso em: 27 de março de 2020.

FABRA, M. J.; LÓPEZ-RUBIO, A.; AMBROSIO-MARTÍN, J.; LAGARON, J. M. Improving the barrier properties of thermoplastic corn starch-based films containing bacterial cellulose nanowhiskers by means of PHA electrospun coatings of interest in food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 261–268, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.025>

FARRIS, S.; SCHAICH, K. M.; LIU, L. S.; PIERGIOVANNI, L.; YAM, K. L. Development of polyion-complex hydrogels as an alternative approach for the production of bio-based polymers for food packaging applications: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 8, p. 316–332, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.04.003>

FATHI, N.; ALMASI, H.; PIROUZIFARD, M. K. Effect of ultraviolet radiation on morphological and physicochemical properties of sesame protein isolate based edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 85, p. 136–143, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.018>

FENG, H.; YANG, W. Power Ultrasound. *In*: HUI, Y. H.; SHERKAT, F. (eds.). **Handbook of Food Science, Technology, and Engineering - Volume 4**. Taylor & Francis Group, LLC, 2006. p. 121-1-121–9. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/b15995>

FLÔRES, S. H.; RIOS, A. de O.; IAHNKE, A. O. S.; DE CAMPO, C.; VARGAS, C. G.; SANTOS, C. D. M.; CAETANO, K. dos S.; STOLL, L.; CRIZEL, T. de M. Films for Food From Ingredient Waste. **Reference Module in Food Science**, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.21366-8>

GARAVAND, F.; ROUHI, M.; RAZAVI, S. H.; CACCIOTTI, I.; MOHAMMADI, R. Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 687–707, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.093>

GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Characterization of Starch and Composite Edible Films and Coatings. *In*: EMBUSCADO, M. E.; HUBER, K. C. (eds.). **Edible Films and Coatings for Food Applications**. Springer Science + Business

Media, LLC, 2009a. p. 169–209. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_6)

GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A.; MARTINO, M.; ZARITZKY, N. Electrically treated composite FILMS based on chitosan and methylcellulose blends. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 722–728, 2009b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.06.008>

GENNADIOS, A.; MCHUGH, T. H.; WELLER, C. L.; KROCHTA, J. M. Edible coatings and films based on proteins. *In*: KROCHTA, J. M.; BALDWIN E. A.; NISPEROS-CARRIEDO, M. O. (eds.). **Edible coatings and films to improve food quality**. Technomic Publishing Company, 1994. p. 201–277.

GENNADIOS, A.; RHIM, J. W.; HANDA, A.; WELLER, C. L.; HANNA, M. A. Ultraviolet radiation affects physical and molecular properties of soy protein films. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 2, p. 225–228, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15714.x>

GEORGE, J.; SIDDARAMAIAH. High performance edible nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 2031–2037, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.10.019>

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, p. 25–29, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>

GHANBARZADEH, B.; OLEYAEI, S. A.; ALMASI, H. Nanostructured Materials Utilized in Biopolymer-based Plastics for Food Packaging Applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 12, p. 1699–1723, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.731023>

GÓMEZ-ESTACA, J.; GAVARA, R.; CATALÁ, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. The Potential of Proteins for Producing Food Packaging Materials: A Review. **Packaging Technology and Science**, v. 29, n. 4–5, p. 203–224, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pts.2198>

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



<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; PÉREZ-MATEOS, M.; GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ-CABALLERO, E.; GIMÉNEZ, B.; MONTERO, P. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 1, p. 3–16, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.10.002>

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; TURNAY, J.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, M. D.; ULMO, N.; LIZARBE, M. A.; MONTERO, P. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 25–34, 2002.

GÓMEZ-LÓPEZ, V. M.; KOUTCHMA, T.; LINDEN, K. Ultraviolet and Pulsed Light Processing of Fluid Foods. *In: Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*. Elsevier Inc., 2012. p. 185–223. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381470-8.00008-6>

GOULLIEUX, A.; PAIN, J.-P. Ohmic Heating. *In: Emerging Technologies for Food Processing*. 2. ed. Elsevier Ltd, 2014. p. 399–426. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411479-1.00022-X>

GUL, O.; SARICA OGLU, F. T.; BESIR, A.; ATALAR, I.; YAZICI, F. Effect of ultrasound treatment on the properties of nano-emulsion films obtained from hazelnut meal protein and clove essential oil. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 41, p. 466–474, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.10.011>

GÜLSEREN, I.; GÜZEY, D.; BRUCE, B. D.; WEISS, J. Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, n. 2, p. 173–183, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2005.07.006>

GÜRLER, N.; PAŞA, S.; TEMEL, H. Silane doped biodegradable starch-PLA bilayer films for food packaging applications: Mechanical, thermal, barrier and biodegradability properties. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 123, p. 261–271, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2021.05.030>

HAGHIGHI, H.; GULLO, M.; LA CHINA, S.; PFEIFER, F.; SIESLER, H. W.; LICCIARDELLO, F.; PULVIRENTI, A. Characterization of bio-nanocomposite films based on gelatin/polyvinyl alcohol blend reinforced with bacterial cellulose nanowhiskers for food

packaging applications. **Food Hydrocolloids**, v. 113, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106454>

HALDEN, K.; DE ALWIS, A. A. P.; FRYER, P. J. Changes in the electrical conductivity of foods during ohmic heating. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 25, n. 1, p. 9–25, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb01055.x>

HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 231–240, 2008.

HERNANDEZ-IZQUIERDO, V. M.; KROCHTA, J. M. Thermoplastic processing of proteins for film formation - A review. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 2, p. 30–39, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00636.x>

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; KANAVOURAS, A.; LAGARON, J. M.; GAVARA, R. Development and characterization of films based on chemically cross-linked gliadins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 21, p. 8216–8223, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf050952u>

HU, H.; ONYEBUEKE, L.; ABATAN, A. Characterizing and Modeling Mechanical Properties of Nanocomposites-Review and Evaluation. **Journal of Minerals and Materials Characterization and Engineering**, v. 09, n. 04, p. 275–319, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/jmmce.2010.94022>

IAHNKE, A. O. e S.; VARGAS, C. G.; MERCALI, G. D.; RIOS, A. de O.; RAHIER, H.; FLÔRES, S. H. Effect of moderate electricfield on the properties of gelatin capsule residue-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 29–35, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.015>

IAHNKE, A. O. S. Desenvolvimento de filmes biodegradáveis e nanofibras a partir de resíduos de cápsulas gelatinosas. **Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS), 2019.

JAMBRAK, A. R.; LELAS, V.; MASON, T. J.; KREŠIĆ, G.; BADANJAK, M. Physical properties of ultrasound treated soy proteins. **Journal of Food Engineering**, v. 93, n. 4, p. 386–393, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.02.001>

JEEVAHAN, J.; CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESAN, S. P.; SRIRAM, V.; BRITTO, J. G.; MAGESHWARAN, G.; DURAIRAJ, R. B. Scaling up difficulties and commercial aspects of edible films for food packaging: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 100, p. 210–222, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.014>

JIANG, Y.; LI, Y.; CHAI, Z.; LENG, X. Study of the physical properties of whey protein isolate and gelatin composite films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 5100–5108, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf9040904>

KADAM, D. M.; THUNGA, M.; WANG, S.; KESSLER, M. R.; GREWELL, D.; LAMSAL, B.; YU, C. Preparation and characterization of whey protein isolate films reinforced with porous silica coated titania nanoparticles. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 1, p. 133–140, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.046>

KANG, H. J.; MIN, S. C. Potato peel-based biopolymer film development using high-pressure homogenization, irradiation, and ultrasound. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 6, p. 903–909, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.025>

KAUR, R.; YADAV, N. Biodegradable Polymeric Film for Food Packaging. **Journal of Applied Packaging Research**, v. 11, n. 2, p. 21–35, 2019.

KIRBY, C. J. Nanotechnology in the Food Sector. *In*: BRENNAN, J. G.; GRANDISON, A. S. (eds.). **Food Processing Handbook**. 2. ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012. p. 693–726. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9783527634361.ch23>

KIRWAN, M. J.; PLANT, S.; STRAWBRIDGE, J. W. Plastics in Food Packaging. *In*: COLES, R.; KIRWAN, M. (eds.). **Food and Beverage Packaging Technology**. Blackwell Publishing Ltd., 2011. p. 157–212.

KOUBAA, M.; ROOHINEJAD, S.; MUNGURE, T. E.; EL-DIN, B. A.; GREINER, R.; MALLIKARJUNAN, K. Effect of emerging processing technologies on maillard reactions. *In*: **Encyclopedia of Food Chemistry**. Elsevier, 2018. p. 76–82. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21652-1>

KROCHTA, J. Proteins as Raw Materials for Films and Coatings: definitions, current status, and opportunities *In*: GENNADIOS, A. (ed.). **Protein-Based Films and Coatings**. Boca

Raton, Fla.: CRC Press. p 1–31, 2002.

KYRIKOU, I.; BRIASSOULIS, D. Biodegradation of agricultural plastic films: A critical review. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 15, n. 2, p. 125–150, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10924-007-0053-8>

LACROIX, M. Mechanical and Permeability Properties of Edible Films and Coatings for Food and Pharmaceutical Applications. *In*: EMBUSCADO, M. E.; HUBER, K. C. (eds.). **Edible Films and Coatings for Food Applications**. Springer Science + Business Media, LLC, 2009. p. 347–366. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_13)

LEADLEY, C. E.; WILLIAMS, A. Pulsed Electric Field Processing, Power Ultrasound and Other Emerging Technologies. *In*: BRENNAN, J. G. (eds.). **Food Processing Handbook**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. p. 201–235. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/3527607579.ch7>

LEE, B. H. Fundamentals and New Aspects. *In*: **Fundamentals of Food Biotechnology**. 2. ed. John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p. 3–140.

LEI, L.; ZHI, H.; XIUJIN, Z.; TAKASUKE, I.; ZAIGUI, L. Effects of different heating methods on the production of protein-lipid film. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 3, p. 292–297, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.02.030>

LEINER, P. B. Gelatina Um Agente Gelificante Único E Natural. **Food Ingredients Brasil**, v. 27, p. 43–47, 2013.

LEITE, L. S. F.; BILATTO, S.; PASCHOALIN, R. T.; SOARES, A. C.; MOREIRA, F. K. V.; OLIVEIRA, O. N.; MATTOSO, L. H. C.; BRAS, J. Eco-friendly gelatin films with rosin-grafted cellulose nanocrystals for antimicrobial packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 2974–2983, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.189>

LIU, C. C.; TELLEZ-GARAY, A. M.; CASTELL-PEREZ, M. E. Physical and mechanical properties of peanut protein films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 7, p. 731–738, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.02.012>

LIU, Z.; LIN, D.; LOPEZ-SANCHEZ, P.; YANG, X. Characterizations of bacterial cellulose

nanofibers reinforced edible films based on konjac glucomannan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 634–645, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.109>

MALONEY, N.; HARRISON, M. Advanced Heating Technologies for Food Processing. *In: Innovation and Future Trends in Food Manufacturing and Supply Chain Technologies*. Elsevier Ltd., 2016. p. 203–256. Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-78242-447-5.00008-3>

MARAN, J. P.; SIVAKUMAR, V.; THIRUGNANASAMBANDHAM, K.; SRIDHAR, R. Degradation behavior of biocomposites based on cassava starch buried under indoor soil conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 20–28, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.080>

MARCUZZO, E.; PERESSINI, D.; DEBEAUFORT, F.; SENSIDONI, A. Effect of ultrasound treatment on properties of gluten-based film. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 3, p. 451–457, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.03.002>

MARTUCCI, J. F.; RUSECKAITE, R. A. Biodegradable three-layer film derived from bovine gelatin. **Journal of Food Engineering**, v. 99, n. 3, p. 377–383, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.02.023>

MARTUCCI, J. F.; RUSECKAITE, R. A. Biodegradation of three-layer laminate films based on gelatin under indoor soil conditions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, n. 8, p. 1307–1313, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.03.018>

MASON, T. J. Power ultrasound in food processing - the way forward. *In: T. J. MASON; J. W. POVEY (eds.). Ultrasounds in food processing*. 1. ed. p. 105–126. *E-book*.

MENTER, J. M.; PATTA, A. M.; SAYRE, R. M.; DOWDY, J.; WILLIS, I. Effect of UV irradiation on type I collagen fibril formation in neutral collagen solutions. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v. 17, n. 3, p. 114–120, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0781.2001.170302.x>

NIKAFSHAR, S.; ZABIHI, O.; AHMADI, M.; MIRMOHSENI, A.; TASEIDIFAR, M.; NAEBE, M. The effects of UV light on the chemical and mechanical properties of a transparent

epoxy-diamine system in the presence of an organic UV absorber. **Materials**, v. 10, n. 2, p. 1–18, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ma10020180>

NOORBAKSH-SOLTANI, S. M.; ZERAFAT, M. M.; SABBAGHI, S. A comparative study of gelatin and starch-based nano-composite films modified by nano-cellulose and chitosan for food packaging applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 189, p. 48–55, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.012>

NOSHIRVANI, N.; HONG, W.; GHANBARZADEH, B.; FASIHI, H.; MONTAZAMI, R. Study of cellulose nanocrystal doped starch-polyvinyl alcohol bionanocomposite films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 2065–2074, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.083>

O'DONNELL, C. P.; TIWARI, B. K.; BOURKE, P.; CULLEN, P. J. Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 7, p. 358–367, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.007>

OGALE, A. A.; CUNNINGHAM, P.; DAWSON, P. L.; ACTON, J. C. Viscoelastic, thermal, and microstructural characterization of soy protein isolate films. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 4, p. 672–679, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb16071.x>

OLIVEIRA, L. M.; ALVES, R. M. V.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; PADULA, M. **Ensaio para Avaliação de Embalagens Plásticas Flexíveis**. Campinas: CETEA/ ITAL, 1996.

OTONI, C. G.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; CHIOU, B. S.; BILBAO-SAINZ, C.; BECHTEL, P. J.; MCHUGH, T. H. Ultraviolet-B Radiation Induced Cross-linking Improves Physical Properties of Cold- and Warm-Water Fish Gelatin Gels and Films. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 9, p. 1–9, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02839.x>

OTTONI, B. L.; DEUS, R. M.; GOBBO JUNIOR, J. A.; CARVALHO, Â. M. G. de; BATTISTELLE, R. A. G. Communication and Biodegradable Packaging Relationship: A Paradigm for Final Disposal. **Journal of Applied Packaging Research**, v. 10, n. 1, p. 2, 2018.

PAGNO, C. H.; COSTA, T. M. H.; DE MENEZES, E. W.; BENVENUTTI, E. V.; HERTZ, P. F.; MATTE, C. R.; TOSATI, J. V.; MONTEIRO, A. R.; RIOS, A. O.; FLÔRES, S. H.

Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 173, p. 755–762, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.068>

PALUDO, N. Obtenção e aplicação de nanofibras de resíduo industrial de kombucha em filmes biodegradáveis. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS), 2021.

PELLISSARI, F. M.; ANDRADE-MAHECHA, M. M.; SOBRAL, P. J. do A.; MENEGALLI, F. C. Comparative study on the properties of flour and starch films of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 2, p. 681–690, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.08.007>

PEREIRA, R. N.; SOUZA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Effects of electric fields on protein unfolding and aggregation: Influence on edible films formation. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 11, p. 2912–2918, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bm100681a>

PÉREZ-GAGO, M. B.; KROCHTA, J. M. Drying Temperature Effect on Water Vapor Permeability and Mechanical Properties of Whey Protein-Lipid Emulsion Films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2687–2692, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf0001583>

RAMOS, M.; VALDÉS, A.; BELTRÁN, A.; GARRIGÓS, M. Gelatin-Based Films and Coatings for Food Packaging Applications. **Coatings**, v. 6, n. 4, p. 41, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/coatings6040041>

REINIATI, I.; HRYMAK, A. N.; MARGARITIS, A. Recent developments in the production and applications of bacterial cellulose fibers and nanocrystals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 510–524, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1189871>

RHIM, J. W.; GENNADIOS, A.; HANDA, A.; WELLER, C. L.; HANNA, M. A. Solubility, tensile, and color properties of modified soy protein isolate films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 4937–4941, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf0005418>

ROBERTSON, G. L. Edible, Biobased and Biodegradable Food Packaging Materials. *In: Food Packaging: principles and practice*. 3. ed. CRC Press, 2012. p. 58–62. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/b21347-8>

ROBERTSON, G. L. State-of-the-art biobased food. *In: Environmentally compatible food packaging*. Woodhead Publishing Limited, 2008. p. 3–28. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1533/9781845694784.1.3>

ROCHA G. O. Obtenção e Caracterização de Filmes Biodegradáveis a partir de Misturas de Amido de Mandioca e Extrato Protéico de Soja. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica (RJ), 2009.

ROONEY, M. L. Introduction to Active Food Packaging Technologies. *In: Innovations in Food Packaging*. Elsevier Ltd., 2005. p. 63–79. Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/b978-012311632-1/50037-1>

ROTTA, J.; OZÓRIO, R. Á.; KEHRWALD, A. M.; DE OLIVEIRA BARRA, G. M.; DE MELO CASTANHO AMBONI, R. D.; BARRETO, P. L. M. Parameters of color, transparency, water solubility, wettability and surface free energy of chitosan/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 2, p. 619–623, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.10.032>

SÃO JOSÉ, J. F. B. de; ANDRADE, N. J. de; RAMOS, A. M.; VANETTI, M. C. D.; STRINGHETA, P. C.; CHAVES, J. B. P. Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. **Food Control**, v. 45, p. 36–50, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.015>

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; ALVES, R. M. V.; COLTRO, L.; PADULA, M.; TEIXEIRA, F. G.; MOREIRA, C. Q. **Embalagens Plásticas Flexíveis: Principais Polímeros e Avaliação de Propriedades**. 2. ed., 2017.

SASTRY, S. K.; BARACH, J. T. Ohmic and Inductive Heating. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 42–46, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2000.tb00617.x>

SCHMID, M.; HELD, J.; HAMMANN, F.; SCHLEMMER, D.; NOLLER, K. Effect of UV-Radiation on the Packaging-Related Properties of Whey Protein Isolate Based Films and



Coatings. **Packaging Technology and Science**, v. 28, p. 883–889, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pts.2150>

SHANKAR, S.; JAISWAL, L.; RHIM, J. W. **Gelatin-Based Nanocomposite Films: Potential Use in Antimicrobial Active Packaging**. Elsevier Inc., 2016. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00027-9>

SIEMANN, U. Solvent cast technology - A versatile tool for thin film production. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 130, p. 1–14, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/b107336>

SILVA-WEISS, A.; IHL, M.; SOBRAL, P. J. A.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; BIFANI, V. Natural Additives in Bioactive Edible Films and Coatings: Functionality and Applications in Foods. **Food Engineering Reviews**, v. 5, n. 4, p. 200–216, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9072-5>

SIRACUSA, V.; ROCCULI, P.; ROMANI, S.; ROSA, M. D. Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, n. 12, p. 634–643, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.07.003>

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizer effect on mechanical properties of  $\beta$ -lactoglobulin films. **Journal of Food Engineering**, v. 50, n. 3, p. 149–155, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00237-5](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00237-5)

SOUZA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; CASARIEGO, A.; LIMA, A. M. P.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Effect of moderate electric fields in the permeation properties of chitosan coatings. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2110–2115, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.03.021>

SOUZA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. The Use of Electric Fields for Edible Coatings and Films Development and Production: A Review. **Food Engineering Reviews**, v. 2, n. 4, p. 244–255, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12393-010-9029-x>

SRIPLAI, N.; PINITSOONTORN, S. Bacterial cellulose-based magnetic nanocomposites: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 254, p. 117228, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117228>

STARK, N. M. Opportunities for cellulose nanomaterials in packaging films: A review and future trends. **Journal of Renewable Materials**, v. 4, n. 5, p. 313–326, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.7569/JRM.2016.634115>

SUDERMAN, N.; ISA, M. I. N.; SARBON, N. M. The effect of plasticizers on the functional properties of biodegradable gelatin-based film: A review. **Food Bioscience**, v. 24, n. June, p. 111–119, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.06.006>

SUHAG, R.; KUMAR, N.; PETKOSKA, A. T.; UPADHYAY, A. Film formation and deposition methods of edible coating on food products: A review. **Food Research International**, v. 136, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109582>

TAHERI, P.; JAHANMARDI, R.; KOOSHA, M.; ABDI, S. Physical, mechanical and wound healing properties of chitosan/gelatin blend films containing tannic acid and/or bacterial nanocellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 421–432, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.114>

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. **Trends in Food Science and Technology**, v. 14, n. 3, p. 71–78, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00280-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00280-7)

TINOCO, A.; RODRIGUES, R. M.; MACHADO, R.; PEREIRA, R. N.; CAVACO-PAULO, A.; RIBEIRO, A. Ohmic heating as an innovative approach for the production of keratin films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 671–680, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.122>

TIWARI, B. K.; MASON, T. J. Ultrasound Processing of Fluid Foods. *In: Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*. Elsevier Inc., 2012. p. 135–165. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381470-8.00006-2>

USTUNOL, Z.; MERT, B. Water solubility, mechanical, barrier, and thermal properties of cross-linked whey protein isolate-based films. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 3, p. 129–133, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13365.x>

VAN SOEST, J. J. G.; Vliegenthart, J. F. G. Crystallinity in starch plastics: Consequences for material properties. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 208–213, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01021-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01021-4)

VARGHESE, K. S.; PANDEY, M. C.; RADHAKRISHNA, K.; BAWA, A. S. Technology, applications and modelling of ohmic heating: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2304–2317, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0710-3>

VERA, A.; TAPIA, C.; ABUGOCH, L. Effect of high-intensity ultrasound treatment in combination with transglutaminase and nanoparticles on structural, mechanical, and physicochemical properties of quinoa proteins/chitosan edible films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 536–543, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.120>

VICENTINI, N. M. Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita. **Tese (Doutorado em Agronomia)**. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu (SP), 2003.

VIÉGAS L. P. Preparação e caracterização de filmes biodegradáveis a partir de amido com quitosana para aplicação em embalagens de alimentos. **Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais)**. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Darcy Ribeiro (RJ), 2016.

WANG, L.; DONG, Y.; MEN, H.; TONG, J.; ZHOU, J. Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 1, p. 35–41, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.034>

WANG, X.; MAJZOBI, M.; FARAHNAKY, A. Ultrasound-assisted modification of functional properties and biological activity of biopolymers: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 65, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105057>

WANG, X.; ULLAH, N.; SUN, X.; GUO, Y.; CHEN, L.; LI, Z.; FENG, X. Development and characterization of bacterial cellulose reinforced biocomposite films based on protein from buckwheat distiller's dried grains. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 353–360, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.106>

WANG, Y. Z.; WENG, Y. X. Special topic on bio-based and biodegradable polymers. **Science China Chemistry**, v. 59, n. 11, p. 1353–1354, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11426-016-0384-4>

WIHODO, M.; MORARU, C. I. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 3, p. 292–302, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.08.021>

WU, Y.; WELLER, C. L.; HAMOUZ, F.; CUPPETT, S. L.; SCHNEPF, M. Development and application of multicomponent edible coatings and filmes: A review. *In: **Advances in Food and Nutrition Research***. Academic Press, 2002. v. 44p. 347–394. *E-book*. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(02\)44007-7](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(02)44007-7)

WWF. World Wide Fund for Nature. **Annual Review 2019**. Disponível em: <http://europe.nxtbook.com/nxteu/wwfintl/annualreview2019/index.php#/8>>. Acesso em 09 de abril de 2020.

XIAO, J.; MA, Y.; WANG, W.; ZHANG, K.; TIAN, X.; ZHAO, K.; DUAN, S.; LI, S.; GUO, Y. Incorporation of gelatin improves toughness of collagen films with a homo-hierarchical structure. **Food Chemistry**, v. 345, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128802>

XIE, Y.; NIU, X.; YANG, J.; FAN, R.; SHI, J.; ULLAH, N.; FENG, X.; CHEN, L. Active biodegradable films based on the whole potato peel incorporated with bacterial cellulose and curcumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 480–491, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.291>

ZACTITI E. M. Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis de Alginato de Cálcio sem e com Sorbato de Potássio. **Tese (Doutorado em Engenharia Química)**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), 2004.

ZHONG, T.; HUANG, R.; SUI, S.; LIAN, Z.; SUN, X.; WAN, A. Effects of ultrasound treatment on lipid self-association and properties of methylcellulose/stearic acid blending films. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 415–423, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.026>

ZHONG, Y.; GODWIN, P.; JIN, Y.; XIAO, H. Biodegradable polymers and green-based antimicrobial packaging materials: A mini-review. **Advanced Industrial and Engineering Polymer Research**, v. 3, n. 1, p. 27–35, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2019.11.002>

ZINK, J.; WYROBNIK, T.; PRINZ, T.; SCHMID, M. Physical, chemical and biochemical modifications of protein-based films and coatings: An extensive review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms17091376>