



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Desenvolvimento e aplicação de filmes biodegradáveis a partir de  
amido de mandioca e microalga verde

MARIEL CARISSIMI

Porto Alegre, 2017



MARIEL CARISSIMI

Desenvolvimento e aplicação de filmes biodegradáveis a partir de  
amido de mandioca e microalga verde

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador (a): Prof. Dra. Rosane Rech

Coorientador (a): Prof. Dra. Simone Hickmann Flôres

Porto Alegre, 2017

### CIP - Catalogação na Publicação

Carissimi, Mariel  
Desenvolvimento e aplicação de filmes  
biodegradáveis a partir de amido de mandioca e  
microalga verde / Mariel Carissimi. -- 2017.  
89 f.

Orientadora: Rosane Rech.  
Coorientadora: Simone Hickmann Flôres.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia  
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Filmes biodegradáveis. 2. Amido de mandioca.  
3. Microalgas. 4. Antioxidante. I. Rech, Rosane,  
orient. II. Hickmann Flôres, Simone, coorient. III.  
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com  
os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Autora: Mariel Carissimi (Engenheira de Alimentos – UCS)

Título da dissertação: Desenvolvimento e aplicação de filmes biodegradáveis a partir de amido de mandioca e microalga verde.

Submetida como parte dos requisitos para a obtenção do grau de MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Aprovado em: ...../...../.....  
Pela banca examinadora:

---

Prof. Dra. Rosane Rech  
Orientadora  
Docente do Instituto de Ciência e  
Tecnologia de Alimentos  
PPGCTA/UFRGS

---

Prof. Dra. Simone Hickmann Flôres  
Coorientadora  
Docente do Instituto de Ciência e  
Tecnologia de Alimentos  
PPGCTA/UFRGS

---

Banca: Prof. Dr. Adriano Brandelli  
Doutor em Ciências Químicas  
PPGCTA/UFRGS

---

Banca: Prof. Dra. Jordana Corralo Spada  
Doutora em Engenharia Química  
DEQUI/UFRGS

---

Banca: Prof. Dra. Nicéia Chies Da Fré  
Doutora em Engenharia Química  
IFRS/Campus Feliz

Homologada em: ...../...../.....  
Por:

---

Prof. Dr. Adriano Brandelli  
Coordenador do PPGCTA

---

Prof. Dr. Vitor Manfroi  
Diretor do ICTA

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço a Deus, pelas oportunidades que a vida me proporcionou, por ter me guiado e me acompanhado pelos caminhos certos que levam as realizações dos meus sonhos.

Aos meus pais, Mario e Teresa, que sempre me incentivaram a buscar pelo conhecimento e pelos meus desejos. Agradeço por terem me ensinado os maiores valores da vida, por todo amor e compreensão, pelo apoio em minhas escolhas e por acreditarem em mim. Vocês são meus exemplos de força e determinação.

Ao meu esposo Fernando, meu maior incentivador, obrigado por todo apoio e compreensão, e principalmente por acreditar que eu conseguiria. Obrigado pelos momentos de descontração, pelo carinho e amor dedicados a mim. Sem você eu não estaria comemorando esse momento.

À minha orientadora Rosane Rech e a coorientadora Simone Hickmann Flôres, por estarem sempre dispostas para auxiliar nos momentos de dúvidas, obrigada pela ajuda e incentivo e principalmente por terem acreditado em mim e terem me dado a oportunidade de trabalhar neste projeto.

Obrigado a todos os colegas dos laboratórios 117 e 211, por terem me ajudaram e me ensinaram muito. As queridas amigas Tânia e Carolina, por tornarem meus dias mais divertidos e também por todo apoio, por sempre estarem dispostas a me ajudar. Vocês são muito especiais.

Aos meus irmãos, Rafael e Gabriel, as minhas cunhadas, Thaís e Eliane, e aos meus sobrinhos, Matheus e Isabela, pelo companheirismo e amizade. Pessoas maravilhosas que tenho por perto, sempre torcendo por mim.

Não posso deixar de agradecer aos meus “amigos pela fé”, pessoas que Deus me permitiu escolher, obrigada por todas as orações dedicadas a mim. E em especial as minhas amigas Cláudia, Ana Luiza, Larissa, Solange, Elizabete, Elizandra e Zenaide, obrigada principalmente pela amizade, por estarem do meu lado em todos os momentos, por se preocuparem comigo e por todas as orações. Obrigada por me passarem força, muitas vezes sem entenderem as situações pelas quais eu estava passando.

À UFRGS e ao ICTA.

À CAPES pela bolsa de estudos.

À banca examinadora, pela disponibilidade e contribuições para o meu trabalho.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

As embalagens têm grande importância na indústria de alimentos, pois tem como função principal proteger os alimentos contra contaminações externas. Porém, grande parte das embalagens tradicionais são produzidas a partir de fontes não renováveis e não biodegradáveis, causando sérios problemas ambientais. Por isso, os filmes e coberturas biodegradáveis vêm despertando atenção e interesse dos pesquisadores e indústrias. Neste trabalho, verificou-se a capacidade de desenvolver filmes biodegradáveis com propriedades antioxidantes, utilizando amido de mandioca, como matriz polimérica, e a adição de diferentes concentrações de biomassa seca e extrato de biomassa das microalgas *Heterochlorella luteoviridis* e *Dunaliella tertiolecta*. Os filmes foram caracterizados quanto a suas propriedades físico-químicas, mecânicas, de barreira, óticas e antioxidantes. Dentre os filmes desenvolvidos, o que apresentou melhores características foi selecionado para a aplicação em embalagem de salmão e avaliação da proteção contra a oxidação. Em geral, a aplicação da biomassa das microalgas ocasionou um aumento na solubilidade, biodegradabilidade e opacidade dos filmes. Já os filmes com aplicação de extrato obtiveram os menores valores para esses parâmetros. A biomassa provocou aumento na elongação na ruptura e redução na resistência a tração e módulo de Young dos filmes; a adição de extrato resultou em características mecânicas inversas a dos filmes adicionados de biomassa. Todos os filmes com a adição das microalgas obtiveram resultados positivos na atividade antioxidante avaliada pelo índice de peróxidos. O filme contendo 2,0 % de extrato de *H. luteoviridis* foi o que apresentou a menor permeabilidade ao vapor de água e boas características mecânicas. Portanto, foi escolhido para aplicação em salmão. Na análise de TBARS, a oxidação lipídica foi retardada, porém ocasionou a diminuição da umidade do peixe. Os resultados obtidos neste trabalho comprovam que a aplicação de biomassa de microalga *H. luteoviridis* e *D. tertiolecta* resultam em filmes biodegradáveis, com elevada atividade antioxidante, porém, com alta solubilidade, o que dificulta a aplicação em alimentos úmidos. Os filmes contendo extrato das microalgas possuem aptidão para serem aplicados em alimentos com maior teor de água.

**Palavras-chave:** filmes biodegradáveis; amido de mandioca; microalgas; antioxidante.





## ABSTRACT

Packaging has great importance in food industry, mainly protecting food against external contamination. However, most of the traditional packaging are produced from non-renewable and non-biodegradable sources, causing serious environmental problems. Therefore, biodegradable films and coatings have been attracting attention and interest from researchers and industries. This work studied the development of biodegradable films with antioxidant properties, using cassava starch as polymer matrix, and the addition of different concentrations of dry biomass and biomass extract of the microalgae *Heterochlorella luteoviridis* and *Dunaliella tertiolecta*. The films were characterized for their physicochemical, mechanical, barrier, optical and antioxidant properties. The film that presented the best characteristics was selected for application in salmon packaging aiming protection against lipid oxidation. In general, the addition of microalgae biomass caused an increase in the solubility, biodegradability and opacity of the films. The films with microalgae extract showed the lowest values of these parameters. The addition of microalgae biomass caused an increase on elongation and rupture and a reduction on the tensile strength and Young's modulus of the films. However, the addition of microalgae extract caused an inverse effect on the mechanical characteristics of the films. All films with microalgae biomass or extract showed higher antioxidant activity evaluated by peroxide index. The film containing 2.0 % extract of *H. luteoviridis* was the one that presented a lowest permeability to water vapor and good mechanical characteristics. Therefore, it was chosen for application in salmon. In the analysis of TBARS, the lipid oxidation was delayed, but caused the decrease of the moisture of the fish. The results showed that the application of *H. luteoviridis* and *D. tertiolecta* microalgae biomass results in biodegradable films, with high antioxidant activity, as high solubility, which makes it difficult to apply nor moist foods. The films containing microalgae extracts suitable for use in foods with higher water content.

**Keywords:** biodegradable films; cassava starch; microalgae; antioxidant.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotomicroscopia da <i>Chlorella</i> sp.....	15
Figura 2 – Fotomicroscopia <i>Dunaliella tertiolecta</i> .....	16
Figura 3 – Incubadora com agitação orbital contendo os pré-inóculos das microalgas.26	
Figura 4 – Desenho 3D do fotobioreator de 2,4 L (KOCHEM et al., 2014). .....	27
Figura 5 – Série de 8 Fotobiorreatores utilizados para o cultivo. ....	28
Figura 6 – Texturômetro utilizado nas análises de propriedades mecânicas. ....	31
Figura 7– Micrômetro Digital usado para a análise de espessura. ....	32
Figura 8 – Cuba de vidro com as células de alumínio para análise de PVA.....	34
Figura 9 – Colorímetro (modelo CR-300, MinoltaCo. Ltd, Japão) utilizado para determinar a cor dos filmes. ....	35
Figura 10 – Óleo de girassol embalado nos filmes biodegradáveis para análise de índice de peróxidos. ....	36
Figura 11 – (a) Amostra de filme biodegradável sobre malha de alumínio. (b) Recipientes plásticos com solo e as malhas de alumínio contendo os filmes. ....	37
Figura 12 – Curva padrão de açúcar redutor (AR) em g/L.....	39
Figura 13 – Amostras de salmão embalados para análise da atividade antioxidante. ..	39
Figura 14 – Etapa de separação das fases dos solventes. ....	41
Figura 15 – Curva padrão de ácido tiobarbitúrico (TBA) com 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP).....	43
Figura 16 – Análise quantitativa da ação enzimática da amilase após a coloração com a solução Lugol. (a) <i>H. luteoviridis</i> e (b) <i>D. tertiolecta</i> . ....	46
Figura 17 – Aspecto visual e percentual de perda de massa dos filmes controle e contendo biomassa (a) e extrato (b) das microalgas, no dia 0 e após 15 dias enterrado em solo. ....	49
Figura 18 – Aspecto visual dos filmes controle e contendo biomassa (a) e extrato (b) de microalga com concentrações de 0,5 %, 1 % e 2 %.....	52
Figura 19 – Resultado do Índice de Peróxidos dos filmes controle e contendo biomassa e extrato de microalga.....	56
Figura 20 – Análise de componentes principais das quatorze formulações de filmes biodegradáveis. ....	58

Figura 21 – Variação do Índice de TBARS do salmão durante os dias de armazenamento. ....	60
Figura 22 – Variação da umidade do salmão durante os dias de armazenamento.....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição Meio f/2 modificado.....	25
Tabela 2 – Umidade, Solubilidade, Permeabilidade ao vapor de água (PVA), Espessura (E) e Propriedades Mecânicas (resistência à tração (RT), alongação na ruptura (ER) e o módulo de Young (MY)) dos filmes controle e contendo biomassa e extrato de microalga. ....	47
Tabela 3 – Cor e Opacidade dos filmes controle e contendo biomassa e extrato de microalga. ....	53

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	OBJETIVOS .....	3
2.1	Objetivo Geral .....	3
2.2	Objetivos Específicos .....	3
3	REVISÃO DA LITERATURA .....	5
3.1	Embalagens alimentícias.....	5
3.1.1	Filmes biodegradáveis ativos .....	6
3.1.2	Filmes biodegradáveis com algas ou extrato de algas .....	9
3.2	Amido de mandioca .....	12
3.3	Plastificantes .....	13
3.4	Microalgas.....	14
3.4.1	<i>Heterochlorella luteoviridis</i> .....	14
3.4.2	<i>Dunaliella tertiolecta</i> .....	16
3.5	Caracterização dos filmes biodegradáveis.....	17
3.5.1	Propriedades físico-químicas .....	18
3.5.2	Propriedades de barreira .....	19
3.5.3	Propriedades ópticas.....	20
3.5.4	Propriedades mecânicas .....	20
3.5.5	Propriedades antioxidantes .....	21
3.5.6	Biodegradabilidade dos filmes .....	23
3.6	Legislações .....	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
4.1	Microalgas.....	25
4.1.1	Meios de cultivo para microalgas .....	25
4.1.2	Pré-inóculo de microalgas .....	26
4.1.3	Cultivo em fotobiorreatores.....	27
4.1.4	Obtenção do extrato de microalgas.....	29
4.2	Elaboração dos filmes .....	29
4.3	Caracterização dos filmes .....	31
4.3.1	Propriedades mecânicas .....	31

4.3.2	Propriedades físico-químicas .....	31
4.3.3	Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	33
4.3.4	Propriedades óticas.....	34
4.3.5	Atividade antioxidante pelo método de oxidação lipídica.....	35
4.3.6	Biodegradabilidade dos filmes .....	36
4.4	Determinação de atividade enzimática .....	38
4.4.1	Determinação qualitativa de amilase .....	38
4.4.2	Determinação quantitativa pelo método de DNS.....	38
4.5	Aplicação do filme em salmão .....	39
4.5.1	Umidade do salmão .....	40
4.5.2	Obtenção do óleo .....	40
4.5.3	Percentual de lipídios .....	41
4.5.4	Índice de peróxidos, dienos e trienos do óleo .....	41
4.5.5	Índice de substancias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	42
4.6	Análise dos resultados .....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
5.1	Caracterização dos filmes .....	45
5.2	Seleção e aplicação da melhor formulação .....	58
5.3	Percentual de lipídios e atividade oxidante do salmão .....	58
6	CONCLUSÃO .....	61
7	PERSPECTIVAS .....	63
8	REFERÊNCIAS .....	65

## 1 INTRODUÇÃO

As embalagens têm um importante papel na conservação dos alimentos, pois atuam como uma barreira de proteção contra impactos físicos, na prevenção de contaminações, no aumento da vida de prateleira, além de conter informações importantes sobre o alimento embalado. Porém, atualmente, a maioria das embalagens utilizadas são derivadas de fontes não renováveis, como o petróleo. Diversos polímeros têm sido utilizados como materiais para embalagens durante muitos anos devido às suas vantagens econômicas e tecnológicas. Esses polímeros sintéticos são hidrofóbicos, não sofrem a ação de microrganismos e levam muitos anos para se decomporem, gerando assim, grande volume de resíduos sólidos, que acarretam sérios problemas ambientais (THARANATHAN, 2003; VARGAS et al., 2008).

O crescimento populacional e econômico na maioria dos países ocidentais teve como consequência um grande aumento na produção de lixo. No Brasil, são coletadas aproximadamente 218 mil toneladas de resíduos sólidos urbanos por dia, dos quais apenas 60 % são destinadas para aterros sanitários ou reciclagem (ABRELPE, 2015). Neste contexto, vários países estão reconhecendo a necessidade de reduzir a quantidade de plásticos desperdiçados e descartados, visando a reciclagem deste material por meio de iniciativas que combinem praticidade e economia.

A indústria de alimentos é o maior usuário de embalagens. Com isso, vários estudos estão sendo realizados para atender à crescente demanda relacionada à sustentabilidade e segurança ambiental. Estes estudos envolvem o desenvolvimento de novos materiais para a produção de embalagens que possam se degradar mais rapidamente. O uso de matéria prima vegetal para a produção de embalagens biodegradáveis é uma alternativa favorável. Os biopolímeros possuem uma alta biodegradabilidade e se decompõem facilmente em subprodutos orgânicos, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e água (H<sub>2</sub>O). Dentre os biopolímeros mais utilizados estão os polissacarídeos, proteínas e lipídeos, empregados em combinação ou separadamente (THARANATHAN, 2003; VARGAS et al., 2008). O amido se destaca por ser um biodegradável, renovável, ter baixo custo e grande disponibilidade em todo o mundo.

As embalagens formadas a partir de macromoléculas biodegradáveis, também chamados de filmes, estão alavancando novas pesquisa com o objetivo de criar embalagens

que possam atuar como uma barreira contra troca de gases e umidade entre o alimento e o ambiente, ou ainda, como uma proteção antioxidativa. As embalagens utilizadas em alimentos, normalmente, são barreiras inertes, sem nenhuma interação com o alimento, apresentando apenas proteção do produto. Entretanto, surgem pesquisas visando o desenvolvimento de filmes biodegradáveis ativos: um sistema de interação entre a embalagem e o alimento. Essa interação pode ocorrer devido a adição de diferentes compostos que retardam ou diminuem o processo de oxidação de produtos embalados, como os antioxidantes ou corantes naturais, que retardam a oxidação devido à barreira de luz (GÓMEZ-ESTACA et al., 2014; PETERSSON; STADING, 2005).

Algumas espécies de microalgas tem a capacidade de produzir compostos de alto valor agregado, como pigmentos, lipídeos, vitaminas e minerais. A sua comercialização como suplementos alimentares já é feita, além de ser utilizada como incremento do conteúdo nutricional de alimentos convencionais, por possuir compostos biologicamente ativos com efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e corantes (GOUVEIA et al., 2010). As microalgas das espécies *Heterochlorella luteoviridis* e *Dunaliella tertiolecta* possuem uma boa concentração de carotenoides, como a luteína,  $\beta$ -caroteno e zeaxantina, e um considerável percentual de ácidos graxos essenciais,  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6 (DIPRAT et al., 2016; MENEGOL et al., 2016).

Neste trabalho foi realizado um estudo para aplicação de biomassa e extrato das microalgas *Heterochlorella luteoviridis* e *Dunaliella tertiolecta* em filmes biodegradáveis com amido de mandioca como matriz polimérica, visando o desenvolvimento de um filme ativo e funcional.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar e aplicar filmes biodegradáveis formulados a partir de amido de mandioca com adição de biomassa ou de extrato das microalgas marinhas *Heterochlorella luteoviridis* e *Dunaliella tertiolecta*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Produzir a biomassa das microalgas *Heterochlorella luteoviridis* e de *Dunaliella tertiolecta* e obter o extrato a partir das biomassas de ambas.
- Desenvolver e caracterizar os filmes obtidos com a adição de biomassa e extrato das microalgas através de análises físicas, estruturais e antioxidantes.
- Comparar as propriedades estruturais e de proteção contra a oxidação lipídica dos filmes adicionado de biomassa e extrato de *Heterochlorella luteoviridis* com os filmes adicionado de biomassa e extrato de *Dunaliella tertiolecta*;
- Avaliar os parâmetros de oxidação de ácidos graxos de salmão embalado no filme selecionado.



### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 Embalagens alimentícias**

Atualmente as embalagens exercem um papel muito importante na indústria de alimentos, além de proteger o alimento, estendendo seu prazo de validade e viabilizando sua distribuição, as embalagens também atuam como uma ferramenta que atende as necessidades dos consumidores na questão de saúde, conveniência e disponibilidade de produtos seguros, possibilitando assim, o acesso a produtos mais frágeis, perecíveis, de alto ou baixo valor agregado. Para a indústria, a embalagem se tornou uma estratégia de competitividade em toda a cadeia de produção, distribuição, vendas e consumo.

Visando melhor atender os consumidores, os produtos comercializados apresentam diferentes categorias de embalagens para proteger o alimento. A embalagem primária é a embalagem que fica em contato direto com o alimento, a secundária, acondiciona uma ou mais embalagens primárias e a terciária, agrupa as embalagens primárias ou secundárias para o transporte. Devido a isso, vários materiais são utilizados para a produção de embalagens, como papel, plástico, vidro, metal e madeira, que podem ser utilizados separadamente ou combinados (DAVIS; SONG, 2006).

O plástico é o material mais utilizado para produção de embalagens devido a suas características mecânicas, estéticas e de baixo custo (GÓMEZ; MICHEL JR, 2013). Assim, ocorreu um grande crescimento da indústria de plástico convencional a partir dos anos de 1950, quando se iniciou o desenvolvimento de polímeros sintéticos com o uso do petróleo (ORTEGA-TORO et al., 2014). Em 2015, a produção mundial de resinas termoplásticas foi de aproximadamente 260 milhões de toneladas, a América Latina representa 5 % da produção mundial, sendo que o Brasil é o país mais representativo com 2,4 %. A indústria de alimentos está entre os setores que mais utilizam esse material, com 19 % da produção total, ficando atrás somente da construção civil (ABIPLAST, 2015).

No entanto, o uso dessas embalagens produzidas a partir de polímeros sintéticos gera uma preocupação mundial, devido ao impacto ambiental negativo causado por esses materiais não biodegradáveis. Somente no Brasil, a geração diária de resíduos sólidos urbanos chega a aproximadamente 218 mil toneladas, sendo 14 % plásticos (ABRELPE, 2015).

Para minimizar esse efeito negativo provocado pelas embalagens sintéticas, a principal alternativa é a reciclagem, porém a substituição parcial ou total de materiais sintéticos por biodegradáveis vem ganhando força. A produção de embalagens a base de biopolímeros, como os amidos e as gelatinas, tem sido destacados nas áreas de pesquisa e desenvolvimento de embalagens (GARCIA; MARTINO; ZARITZKY, 2000).

### **3.1.1 Filmes biodegradáveis ativos**

O desenvolvimento e uso de embalagens biodegradáveis são alternativas para substituição de materiais sintéticos. Uma das principais vantagens de se utilizar embalagens biodegradáveis é a redução de consumo de combustíveis fósseis não renováveis, como o petróleo, e reduzir a produção de resíduos sólidos não biodegradáveis e as áreas de aterros sanitários. Polímeros biodegradáveis geram uma baixa agressividade à natureza. Devido a sua rápida degradação, podem ser compostados, onde ocorre a mineralização a baixas temperaturas por ação de microrganismos, que metabolizam os biopolímeros convertendo-os em substâncias naturais, como dióxido de carbono, metano, água e biomassa. Além disso, o dióxido de carbono liberado pela degradação pode ser consumido pelas plantas que o utilizam para sintetizar os biopolímeros. A biodegradabilidade de um material depende de vários fatores, intrínsecos e extrínsecos, como área superficial, massa molar e cristalinidade do polímero, além de atividade microbiana do ambiente, temperatura, pH, oxigênio e umidade (FEIL, 1995; SHAH et al., 2008).

Biofilmes ou filmes biodegradáveis são assim nomeados por serem produzidos a partir de materiais biodegradáveis, ou seja, materiais que sofrem degradação por atividade biológica natural. O termo biopolímeros é utilizado para se referir à polímeros sintetizados a partir de matérias primas renováveis, obtidas naturalmente, tais como, amido, celulose e proteínas (WIHODO; MORARU, 2013). As embalagens biodegradáveis são caracterizadas por formulações de baixo custo, ainda mais quando utilizam matérias primas de origem agropecuária como amidos e proteínas (SAKANAKA, 2007). E podem ser denominados como “embalagem de material comestível” quando produzidos com matérias primas adequadas para o consumo humano.

Essas embalagens biodegradáveis podem ser produzidas de maneiras diferentes, gerando filmes ou revestimentos. As embalagens no formato de filmes biodegradáveis são estruturas finas pré-formadas em formato de película plástica, que normalmente são produzidos pela técnica de *casting* ou por extrusão e são utilizadas para embalar os alimentos (SILVA-WEISS et al., 2013; THARANATHAN, 2003). Já os revestimentos ou coberturas são formados diretamente sobre o alimento. Onde o alimento pode ser submergido na solução filmogênica ou através da aspersão da solução sobre o alimento. Esta técnica é utilizada em alimentos individuais e que normalmente não possuem proteção natural, tais como cogumelos (EISSA, 2007), cerejas (YAMAN; BAYOINDIRLI, 2002) e queijos (ZHONG; CAVENDER; ZHAO, 2014).

Os filmes e revestimentos comestíveis estão sendo muito estudados, pois além das vantagens ambientais, eles também apresentam características benéficas quanto as propriedades de barreira seletiva de umidade e gases comparados às embalagens tradicionais. Isso auxilia na manutenção da qualidade do alimento, formando barreiras contra migração de umidade, dióxido de carbono, aromas e sabores, pois essa barreira regula a atmosfera em torno dos alimentos. Também auxiliam na diminuição da perda de nutrientes e cor, e ainda podem apresentar atividade antimicrobiana e/ou antioxidante (SILVA-WEISS et al., 2013). A aplicação desses filmes em alimentos em escala comercial ainda é limitada e depende de fatores como preço, processos de produção e estudo das propriedades dos materiais utilizados (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

Dependendo do alimento a ser embalado e de sua deterioração, a embalagem deve desempenhar funções diferentes. Mas, a composição do filme e as condições ambientais também influenciam no êxito da utilização destas embalagens. Na Europa, filmes biodegradáveis já estão sendo comercializados. Em 2004, na Alemanha, 120 mil embalagens à base de amido foram produzidas pela *Natura Packaging GmbH* e utilizadas para embalar produtos orgânicos. Filmes de amido são usados como barreira contra oxidação de gorduras em produtos de confeitaria e em embalagens de margarina e manteiga, assim, o grupo australiano *Cadbury Schwepps* utiliza embalagens biodegradáveis para embalar seus chocolates. Ainda, a empresa irlandesa *Tipperary*, fabrica copos a partir de polímeros biodegradáveis e embalagens para fins não alimentícios, como sacos de lixo, já estão disponíveis na Itália, Finlândia e Dinamarca (WIHODO; MORARU, 2013)

Entre as funções do filmes biodegradáveis, destacam-se o controle da passagem de O<sub>2</sub> (em alimentos facilmente oxidáveis), retenção de aditivos, sequestro de etileno, ação antimicrobiana, etc. Muitas pesquisas vêm sendo realizadas neste campo, no qual a grande preocupação é garantir que o agente ativo adicionado ao filme não prejudique a inocuidade do produto embalado (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

A incorporação de agentes ativos na matriz polimérica vem ganhando espaço em pesquisas e desenvolvimento de embalagens, pois podem resultar em embalagens ativas. O conceito de embalagens ativas define que esse tipo de material interage com o alimento, corrigindo deficiências das embalagens passivas e agindo de forma favorável na preservação e na qualidade dos alimentos, podendo aumentar a sua vida de prateleira, mantendo a qualidade do produto embalado e melhorando suas propriedades sensoriais. Esses agentes podem ter diferentes funcionalidades, tais como atividades antioxidante e antimicrobiana, e propriedades antiescurecimento, dentre outras (LÓPEZ-DE-DICASTILLO et al., 2010; ROJAS-GRAÜ; SOLIVA-FORTUNY; MARTÍN-BELLOSO, 2009; VERMEIREN et al., 1999).

Dentre estes agentes, antioxidantes naturais fazem parte de uma importante classe de compostos que estão distribuídos em frutas, legumes, grãos, sementes, folhas, cascas e raízes. Quando adicionados a embalagens, estes compostos podem retardar a oxidação do alimento embalado, evitando mudanças de cor e sabor, e perdas nutricionais. A capacidade antioxidante de um composto bioativo depende de estrutura química, concentração e biodisponibilidade do mesmo (DE ALMEIDA MELO et al., 2008).

Estudos apontam que a aplicação de compostos antioxidantes na embalagem tem vantagens quando comparado com a aplicação diretamente no alimento, portanto o desenvolvimento de filmes com a adição destes agentes proporciona uma alternativa para embalagens alimentícias funcionais (BOLUMAR; ANDERSEN; ORLIEN, 2011). As embalagens com antioxidantes, como os carotenoides, também tem como característica diminuir a oxidação lipídica de alimentos gordurosos (FALGUERA et al., 2011).

Diversos compostos ativos, como os antioxidantes naturais, dentre eles tocoferóis, carotenoides e vitaminas, auxiliam na melhora da estabilidade da oxidação lipídica e no prolongamento da vida de prateleira dos alimentos (BROINIZI et al., 2007). Além da sua ação antioxidante, os carotenoides também têm atividade provitamina A, que podem prevenir

doenças oculares graves e infecções de pele. Carotenoides são pigmentos lipossolúveis amplamente distribuídos na natureza, encontrados em todos os tecidos fotossintetizantes e também em partes não fotossintéticas de plantas, portanto são responsáveis pelas diferenças de cores em frutas, legumes, plantas e algas. Atualmente existem mais de 600 tipos de carotenoides na natureza, dentre eles o  $\alpha$ -caroteno, o  $\beta$ -caroteno e a  $\beta$ -criptoxantina que são os principais precursores de vitamina A (BEN-AMOTZ; FISHER, 1998).

O desenvolvimento de um filme a base de gelatina de peixe com extrato de chá verde resultou na melhora das propriedades mecânicas, barreira de luz e de vapor de água. Além disso, melhorou a atividade antioxidante do filme, porém ocorreu uma diminuição desta atividade durante o armazenamento (WU et al., 2013). As mesmas características foram observadas em estudo feito com uma série de filmes de gelatina com adição de diferentes antioxidantes naturais (extrato de chá verde, extrato de semente de uva, extrato de gengibre e extrato de folha de ginkgo) (LI et al., 2014).

A utilização de filmes biodegradáveis que tenham por objetivo a conservação da qualidade e o aumento da validade dos alimentos já foi testada em diversos produtos e com aplicação de diferentes ingredientes. Estudos avaliaram a aplicação de revestimento em maçã (CHIUMARELLI; HUBINGER, 2012), morango (VELICKOVA et al., 2013), mamão papaia e abacaxi (CORTEZ-VEGA et al., 2014), frutas cítricas (ARNON et al., 2014), batata (OJEDA; SGROPPO; ZARITZKY, 2014), abóbora (LAGO-VANZELA et al., 2013) e tomate-cereja (PAGNO, 2016). Revestimentos de filmes biodegradáveis também foram testados e avaliados em alimentos de origem animal como queijo muçarela (ZHONG; CAVENDER; ZHAO, 2014), peixes (SOARES; MENDES; VICENTE, 2013) e carnes de frango (CAETANO et al., 2017).

### **3.1.2 Filmes biodegradáveis com algas ou extrato de algas**

As microalgas e cianobactérias são fontes de carotenoides, porém cada classe de microalga tem sua própria combinação de pigmentos, o que proporciona colorações distintas entre elas. Os pigmentos mais comumente encontrados na biomassa de microalgas são as clorofilas, carotenoides e ficobilinas (ficobiliproteínas) (OROSA et al., 2000).

Alguns estudos já têm sido feitos com a aplicação de algas em filmes biodegradáveis, porém sem avaliar o efeito antioxidante das algas sobre o alimento. Filme comestível a base

de polietilenoglicol e glicerol, acrescido de extrato de *Gelidium corneum*, um tipo de alga vermelha, e catequina, um polifenol com ação antioxidante, foi utilizado para revestimento de salsichas (KU; HONG; SONG, 2008). Esse mesmo extrato de alga também foi utilizado em filmes, onde tiveram a resistência a tração e alongação na ruptura aumentadas e a permeabilidade ao vapor de água melhorada com a incorporados do extrato e da nanoargila (Cloisite NA + e 30B), e também um efeito antimicrobiano com a adição de extrato de semente de uva ou timol (LIM; JANG; SONG, 2010).

Aplicação de algas vermelhas em filme a base de proteína de farelo de arroz foi testado por Shin, Jang e Song (2011). As dosagens testadas foram de 1 %, 2 % e 3 % de alga vermelha na formulação contendo 5 % de proteína de farelo de arroz. Neste estudo foram avaliadas as propriedades mecânicas dos filmes, como resistência à tração, alongamento e permeabilidade ao vapor de água. Primeiramente foi avaliada a aplicação de diferentes plastificantes (sacarose, sorbitol e frutose), a formulação foi composta de 4 % de proteína de farelo de arroz e 2 % de plastificante, onde com frutose o filme apresentou uma melhor resistência a tração e alongamento. Após foram testadas diferentes porcentagens de proteína de farelo de arroz (3 %, 4 % e 5 %) e 1 % de alga vermelha e porcentagem aprovada de proteína foi de 5 %, pois aumentou a resistência a tração, porém diminuiu o alongamento e a permeabilidade ao vapor de água. Somente a partir disso é que foram testadas as dosagens de alga vermelha citadas acima. O resultado de tração aumentou com o aumento da concentração de alga, já o alongamento diminuiu e a permeabilidade ao vapor de água não foi alterada (SHIN; JANG; SONG, 2011).

Outro estudo avaliou o uso de diferentes plastificantes (glicerol, sorbitol, sacarose, frutose e polipropilenoglicol) e nanoargila (Cloisite Na<sup>+</sup> e Cloisite 30B) sobre as propriedades mecânicas (resistência à tração, alongamento na ruptura) e a permeabilidade ao vapor de água de filme com adição de alga vermelha. Os testes com nanoargila foram feitos com 1 %, 3 % e 5 %, onde os melhores resultados para propriedades mecânicas foram com 3 %. A espessura dos filmes contendo Cloisite 30B aumentou com o aumento da quantidade de nanoargila. Em relação aos plastificantes, foi concluído que a sacarose apresentou os menores resultados para resistência a tração e alongamento. O glicerol apresentou uma espessura menor, porém um alongamento maior, isso ocorre devido a mudanças nas interações poliméricas. Os resultados para o sorbitol e a frutose foram mais parecidos devido a



semelhança das estruturas químicas dos plastificantes e os valores de resistência a tração e alongamento foram os maiores obtidos. A frutose foi considerada o melhor plastificante, pois tem interações favoráveis com os grupos reativos da agarose, que é um hidrocoloide contido nas algas vermelhas (JANG et al., 2011).

Filme comestível à base de polietilenoglicol e glicerol foi utilizado para revestimento de salsichas e acrescido de extrato de *Gelidium corneum*, um tipo de alga vermelha, e catequina, um polifenol com ação antioxidante. A aplicação de 1,5 % do extrato de alga e de catequina melhorou a resistência à tração e a permeabilidade ao vapor de água, além da catequina ser eficaz contra a inibição de microrganismos durante o armazenamento de 12 dias (KU; HONG; SONG, 2008).

Esse mesmo extrato de alga também foi utilizado em filmes em quantidade de 1,5 %. Neste estudo o objetivo foi melhorar as propriedades do filme contendo *Gelidium corneum* com a incorporação de nanoargila (Cloisite NA<sup>+</sup> e 30B) e para avaliar propriedades antimicrobianas com a adição de extrato de semente de uva ou timol. A porcentagem de 3 % de ambas nanoargilas aumentou a resistência à tração, o alongamento e a permeabilidade ao vapor de água. A adição do extrato de semente de uva e do timol não alteraram as propriedades mecânicas do filme, mas inibiram o crescimento de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, aumentando a zona de inibição com o aumento da porcentagem dos antimicrobianos (0,8 %, 1 % e 1,2 %) (LIM; JANG; SONG, 2010).

Extrato de algas marrons também foram pesquisados para adição em filmes comestíveis. O extrato da macroalga marinha *Turbinaria ornata* foi utilizado como proteína de reticulação em filme de gelatina de pele de peixe. Os testes foram feitos em soluções com dois valores de pH diferentes (9 e 10) e um controle (sem extrato de alga e sem ajuste de pH). Todas as amostras foram feitas como base de gelatina e adição de glicerol e catequina. Nas amostras com pH 9 e 10 foram adicionadas 6 % de extrato de alga marrom. As análises de espessura e resistência à tração foram semelhantes ao controle, porém o alongamento das amostras com extrato de alga foi duas vezes maior. Isso pode ter ocorrido devido ao ajuste de pH, que influencia na repulsão eletrostática dos grupos ionizados, sob essas condições as interações entre a proteína e os compostos fenólicos do extrato de alga se tornam mais fortes devido as ligações hidrofóbicas e as pontes de hidrogênio. Em pH alcalino os compostos

fenólicos podem ser convertidos em quinona e essas atacam os grupos amino nucleofílicos da gelatina, conduzindo à formação de ligações cruzadas. Já os resultados de permeabilidade ao vapor de água foram menores para as amostras com extrato de alga. A análise de luminosidade não teve impacto, já o índice de cor verde e amarelado foi maior para as amostras com extrato de alga, isso devido aos pigmentos contidos no extrato (RATTAYA; BENJAKUL; PRODPRAN, 2009).

### **3.2 Amido de mandioca**

O amido se difere dos demais carboidratos devido a suas características em relação aos aspectos químicos, físicos e nutricionais. Sua estrutura é formada por dois polímeros: amilose e amilopectina. A amilose é um polímero não ramificado formado por unidades de anidroglicose com ligações  $\alpha$ -1,4. Já a amilopectina se difere da amilose por conter cerca de 5 % das unidades de anidroglicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,6, o que resulta em um polímero ramificado. A proporção desses polímeros no amido pode variar dependendo da sua fonte botânica, do local e das condições de cultivo. O amido de mandioca tem teores de amilose que variam de 16 % a 24 %, e de 76 % a 84 % para amilopectina (BOBBIO; BOBBIO, 1992; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A gelatinização do amido é a propriedade de maior importância para a formação de filmes. Esse processo ocorre durante o aquecimento do amido com excesso de água ocasionando o inchamento dos grânulos. Este gel formado na gelatinização, quando desidratado, dá origem as películas. O amido está entre os principais biopolímeros utilizados para a fabricação de filmes biodegradáveis e comestíveis, devido ao seu baixo custo, fácil manuseio e formação de gel, totalmente biodegradável e amplamente disponível na natureza (BERGO; MORAES; SOBRAL, 2012; DE MORAES et al., 2013).

O amido de mandioca é uma boa matéria prima para a elaboração de filmes pois apresenta uma baixa temperatura de gelatinização, em torno de 60 °C, forma géis transparentes e estáveis devido a quantidade de amilose, do grau de cristalinidade e do comprimento das cadeias de amilopectina (ZHOU et al., 2002). Os filmes a base de amido de mandioca são transparentes e fáceis de processar, além de serem capazes de conferir uma barreira contra oxigênio e dióxido de carbono. Porém, essas embalagens são muito frágeis,

com alta solubilidade e permeabilidade ao vapor de água e baixa resistência mecânica. Portanto, a elaboração de filmes a base de amido são geralmente associadas a outros materiais, sintéticos ou orgânicos, como plastificantes para reduzir sua fragilidade e melhorar as características mecânicas e de permeabilidade de água e gás (ARVANITTOYANNIS; BILIADERIS, 1999).

### **3.3 Plastificantes**

Os filmes elaborados somente com amido são quebradiços e pouco flexíveis. Durante a gelatinização do amido, as moléculas de amilose e amilopectina são liberadas na solução que interagem mediante pontes de hidrogênio. Assim, essas moléculas sozinhas formam um filme com estrutura bifásica, uma rica em amilose e outra rica em amilopectina (AND; HAN, 2005). Os agentes plastificantes reduzem as pontes de hidrogênio entre as cadeias dos polímeros, provocando mudanças físicas, químicas e mecânicas nos filmes, devido ao alto ponto de fusão e baixa volatilidade dos plastificantes (MCHUGH; KROCHTA, 1994).

Os plastificantes mais utilizados em filmes são monossacarídeos e oligossacarídeos (glicose, frutose e sacarose), polióis (glicerol e sorbitol), e lipídeos (ácidos graxos e tensoativos). Estes podem ser facilmente incorporados nas cadeias poliméricas, provocando mudanças na temperatura de transição vítrea, assim, melhorando as propriedades físico-químicas e mecânicas dos filmes (MCHUGH; KROCHTA, 1994).

O glicerol e o sorbitol são substâncias hidrofílicas devido a presença de grupos hidroxila na cadeia, possibilitando uma boa interação com as matérias primas do filme. Apesar de melhorar a flexibilidade e facilitar o manuseio, a sua utilização pode diminuir as propriedades de barreira e aumentar a permeabilidade aos vapores de água e a solubilidade dos filmes (LIN; CHEN; RUN-CHU, 2000; SOUZA; SILVA; DRUZIAN, 2012).

Para filmes de amido, o glicerol é um agente plastificante bastante efetivo, pois tem pouca interação com as moléculas poliméricas (SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007). Durante as modificações da estrutura na rede de amido, os plastificantes provocam alterações na força intermolecular das cadeias poliméricas, resultando em uma matriz filmogênica menos densa, possibilitando o alongamento e a diminuição na resistência a tração (SOUZA et al., 2012).

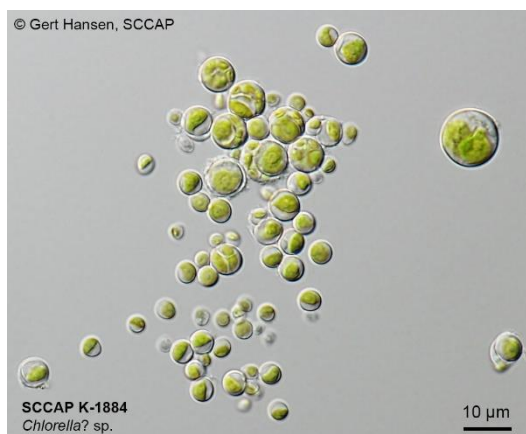
### 3.4 Microalgas

Microalgas englobam microrganismos algais com clorofila e outros pigmentos fotossintéticos, uni ou multicelulares e são classificadas em procarióticos (cianobactérias) ou eucarióticos. Apesar das diferenças estruturais e morfológicas, esses microrganismos são fisiologicamente similares e são capazes de realizar fotossíntese (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; RAVEN; EVANS; KORB, 1999; WALKER et al., 2005). Por possuírem estruturas simples podem ser encontradas em todos os ecossistemas, aquáticos e terrestres. Podem crescer em água doce ou salina, com pouca água e nutrientes, e na presença de dióxido de carbono (AHMAD et al., 2011).

Atualmente, a principal utilização das microalgas tem sido na aquicultura, para alimentação de peixes, moluscos e crustáceos. Porém, como a biomassa obtida dos cultivos tem uma grande biodiversidade e uma composição bioquímica variada, assim, ela está sendo utilizada na elaboração de alimentos com valor agregado ou na forma de suplementos. Dentre os inúmeros compostos, podem estar presentes os ácidos graxos poli-insaturados (ácido araquidônico - ARA, ácido eicosapentaenoico - EPA e ácido docosaheptaenoico - DHA, por exemplo), carotenoides (astaxantina,  $\beta$ -caroteno, luteína etc.), ficobilinas, polissacarídeos, vitaminas, esteróis e diversos compostos bioativos naturais (antioxidantes, redutores do colesterol etc.)(ABALDE; FABREGAS; HERRERO, 1991; SPOLAORE et al., 2006).

#### 3.4.1 *Heterochlorella luteoviridis*

As microalgas do gênero *Chlorella* são pertencentes ao grupo das *Chlorophytas*, caracterizadas por serem algas verdes, unicelulares, com forma esférica, globular ou elipsoidal que podem atingir diâmetro entre 2  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$ , e não possuem flagelos, portanto não são móveis. A Figura 1 apresenta uma fotomicroscopia da *Chlorella*. Algumas espécies de *Chlorella* podem ser marinhas e outras são dulcícolas e apresentam alta tolerância ao dióxido de carbono. Tem como características relevantes a capacidade de se adaptar ao meio de cultivo, pois possuem metabolismo autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; NURACHMAN et al., 2015; WIDJAJA; CHIEN; JU, 2009; ZHANG et al., 2010).



**Figura 1** – Fotomicroscopia da *Chlorella* sp.

(<http://www.sccap.dk/pix/K-1884.jpg>. Acesso em 28/10/2016).

Esta microalga tem rápido crescimento e em sua composição média tem aproximadamente 20 % de lipídeos, 45 % de proteínas, 20 % de carboidratos e 10 % de minerais e vitaminas (PHUKAN et al., 2011). As *Chlorellas* produzem pigmentos fotossintéticos, como clorofilas e carotenoides, com alto potencial para aplicação comercial como suplementos alimentares e aditivos, além de serem utilizadas em cosméticos e fármacos (NURACHMAN et al., 2015).

A *Chlorella* é cultivada no Japão desde 1960. No ano 1962 a empresa *Nihon Chlorella* iniciou a comercialização da microalga como suplemento alimentar (LOURENCO, 2006). Em 1980, na Ásia, a produção de biomassa já era de 1000 kg por mês em aproximadamente 26 fábricas (SPOLAORE et al., 2006). Espécies de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa* e *Chlorella luteoviridis* foram comercializadas na União Europeia até 1997 e vários estudos foram feitos sobre as variedades *C. vulgaris* e *C. pyrenoidosa* tendo sua composição completa de carotenoides na literatura (GOUVEIA et al., 1996; INBARAJ; CHIEN; CHEN, 2006). A *C. luteoviridis* foi recentemente renomeada como *Heterochlorella luteoviridis* após uma revisão taxonômica (NEUSTUPA et al., 2013).

As *Chlorellas* são ótimas fontes de luteína,  $\beta$ -caroteno, zeaxantina e violaxantina. A composição de carotenoides da *H. luteoviridis* inclui treze carotenoides, dentre os principais estão 1,18 mg g<sup>-1</sup> de trans-luteína, 0,52 mg g<sup>-1</sup> de trans-violaxantina e 0,50 mg g<sup>-1</sup> de trans- $\beta$ -caroteno. A presença majoritária de luteína está acima dos valores encontrado em outros alimentos como pimenta vermelha (1,09  $\mu$ g g<sup>-1</sup>) e alface (0,95  $\mu$ g g<sup>-1</sup>). Ainda, apresenta uma

atividade de pró-vitamina A ( $71 \mu\text{g RAE g}^{-1}$ ) maior que alimentos como abóbora ( $50 \mu\text{g RAE g}^{-1}$ ) e cenoura ( $32 \mu\text{g RAE g}^{-1}$ ) (DIPRAT et al., 2016).

Além dos carotenoides, as microalgas verdes são ricas em ácidos graxos essenciais como o  $\alpha$ -linolênico ( $\omega 3$ ) e o linoleico ( $\omega 6$ ) que tem função importante para as células inflamatórias e imunológicas, diminuindo o risco de doenças cardiovasculares (GALLI; CALDER, 2009). A *H. Luteoviridis* é apresentada como uma fonte de ácidos graxos poli-insaturados com uma baixa relação  $\omega 6:\omega 3$  (MENEGOL et al., 2016).

### 3.4.2 *Dunaliella tertiolecta*

A *Dunaliella tertiolecta* também é uma microalga da divisão das *Chlorophytas*, portanto de cor verde e fitoplantônica; apresenta geometria elipsoidal de tamanho de célula entre  $6 \mu\text{m}$  e  $14 \mu\text{m}$  e são dinoflageladas, conforme apresentado na Figura 2 (TANG et al., 2011).



**Figura 2** – Fotomicroscopia *Dunaliella tertiolecta*

(<http://www.sccap.dk/pix/K-0591.jpg>. Acesso em 28/10/2016).

Para a produção de biomassa dessa microalga pode-se utilizar nutrientes inorgânicos presentes na água salgada, águas residuais ou água salobra juntamente com a luz solar e  $\text{CO}_2$  como única fonte de carbono. Além disso, esta espécie móvel tem elevada tolerância ao sal, temperatura e luz. O cultivo desse microrganismo é relativamente simples, pois não se fixam

em superfícies e tem taxa de crescimento e conteúdo lipídico relativamente elevados (TANG et al., 2011).

A *D. tertiolecta* não possui parede celular rígida e prolifera em faixa de salinidade entre 0,17 M a 1,5 M de NaCl. Esse grau de adaptação deve-se a produção de  $\beta$ -caroteno e glicerol em excesso para manter o equilíbrio osmótico. A resposta da microalga as mudanças de salinidade do meio de cultivo corresponde a alteração da quantidade de lipídeos em suas células (FISHER et al., 1996; GOYAL, 2007; OUKARROUM et al., 2012; TAKAGI; KARSENO; YOSHIDA, 2006).

Com o avanço neste campo nos últimos anos, a produção de compostos bio-orgânicos, como  $\beta$ -caroteno, está estabelecida em muitos países. A produção em larga escala de  $\beta$ -caroteno é controlada por inúmeros fatores de estresse, como alta intensidade de luz e salinidade, baixa temperatura e disponibilidade de nutrientes. O estresse por alta luminosidade é criado quando a incidência de luz é maior do que a necessária para a fotossíntese da planta. Infelizmente, existe uma relação inversa entre a produção de  $\beta$ -caroteno e a velocidade de crescimento específico das células. Usualmente, as condições de cultivo em sistemas fechados são otimizadas para uma maior produção de  $\beta$ -caroteno (FAZELI et al., 2006). Em espécies de microalgas halotolerantes, como é o caso do gênero *Dunaliella tertiolecta*, foi encontrado uma composição com doze carotenoides, sendo os majoritários trans-luteína (1,59 mg g<sup>-1</sup>), trans- $\beta$ -caroteno (0,62 mg g<sup>-1</sup>) e trans-violaxantina (0,45 mg g<sup>-1</sup>). Além, de também conter atividade pró-vitamina A de 61  $\mu$ g RAE g<sup>-1</sup>. Assim como a *H. Luteoviridis*, a *D. tertiolecta* também pode ser considerada uma excelente fonte de luteína e com alta atividade pró-vitamina A (DIPRAT et al., 2016).

### **3.5 Caracterização dos filmes biodegradáveis**

Os filmes biodegradáveis são estruturas poliméricas que serão aplicadas sobre alimentos objetivando proteção e aumento da sua vida de prateleira. Portanto, a avaliação de suas propriedades é muito importante, uma vez que eles poderão substituir materiais não biodegradáveis nas embalagens (BOURTOOM, 2008).

Para utilizar um filme como embalagem de alimentos, algumas características desejáveis devem ser observadas, como propriedades físico-químicas (espessura, umidade e

solubilidade em água), propriedades de barreira (permeabilidade ao vapor de água), propriedades óticas (opacidade e cor) e propriedades mecânicas (elasticidade, resistência e rigidez) (WIHODO; MORARU, 2013).

### **3.5.1 Propriedades físico-químicas**

As propriedades físicas-químicas geram consequências nas características funcionais, propriedades de barreira e mecânicas dos filmes e são de grande importância para determinar a aplicação em um alimento. Dentre essas propriedades estão a espessura, umidade e solubilidade em água.

A espessura dos filmes é uma propriedade relacionada a uniformidade do material, e é definida como a distância entre as duas superfícies do filme. A análise de espessura auxilia nas informações sobre a resistência mecânica, propriedades de barreira, como permeabilidade ao vapor de água, e propriedades óticas, onde algumas deficiências nessas propriedades podem estar ligadas a variações na espessura dos filmes (HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008). Estas variações podem ocorrer devido a fatores como a concentração de amido, adição de aditivos, quantidade de solução filmogênica na placa e o modo de preparo dos filmes. Com o aumento da concentração de amido e/ou sólidos totais a espessura do filme aumenta (SOUZA; SILVA; DRUZIAN, 2012; ZAVAREZE et al., 2012).

Em processos de produção tipo *casting*, onde ocorre a secagem por evaporação de soluções filmogênicas viscosas em finas camadas espalhadas em placas ou superfícies, o controle da espessura dos filmes é mais difícil, devido à dificuldade em espalhar esse material nas mesmas, pela concentração ( $\text{g/cm}^2$ ) da solução depositada na placa e também pelo tempo e temperatura de secagem utilizados (PETRIKOSKI, 2013).

O conteúdo de umidade é um parâmetro relacionado com o volume total ocupado por moléculas de água na rede microestrutural do filme, já a solubilidade é relacionada com a hidrofobicidade do material (JIANG et al., 2010). A solubilidade é de extrema importância, pois a afinidade do filme com a água pode ser desejável ou não. Em casos como de encapsulamento ou revestimento de alimentos, aditivos ou medicamentos o filme deve ser solúvel em água. Ao contrário, em embalagens onde se deseja a proteção e integridade do produto contra a água, esse filme precisa ser insolúvel (ZAVAREZE et al., 2012).



A solubilidade é muito influenciada pelo tipo e concentração do polímero utilizado, aditivos e plastificantes adicionados à formulação. Isso indica as características do filme quando imerso em água, em contato com ambientes úmidos ou superfícies aquosas. Os plastificantes têm grande efeito na solubilidade. Estudos realizados com filmes à base de amido de mandioca apresentaram alterações na solubilidade e na permeabilidade ao vapor de água em diferentes concentrações de plastificantes. O grupamento hidroxila, presente nos plastificantes, como sorbitol e glicerol, aumentam a solubilidade do filme, pois possuem caráter hidrofílico. O plastificante interage com a água, incorporando-a à rede do filme através das ligações de hidrogênio. Ainda, a solubilidade pode ser aumentada devido a interação do plastificante com a matriz polimérica, isso afasta os espaços entre as cadeias, facilitando a migração de água para a estrutura (CHIUMARELLI; HUBINGER, 2012; MÜLLER; YAMASHITA; LAURINDO, 2008; VIEIRA et al., 2011a).

### **3.5.2 Propriedades de barreira**

As propriedades de barreira têm grande importância para conservação de alimentos, pois as embalagens têm a característica de dificultar ou impedir o contato do ambiente externo com o alimento embalado. Essas propriedades estão relacionadas com a estrutura do produto embalado, bem como com a estabilidade física, química, sensorial e microbiológica (SANTOS; YOSHIDA, 2011).

A permeabilidade ao vapor de água é uma das propriedades de barreira mais importante. Essas propriedades são influenciadas pela qualidade e características da matéria prima utilizada para fabricação do filme, assim como pela adição de plastificantes e aditivos. Os plastificantes diminuem a densidade do filme, por isso a permeabilidade ao vapor de água geralmente é proporcional a quantidade de plastificante utilizado na formulação (SOUZA; SILVA; DRUZIAN, 2012).

A espessura do filme e fatores extrínsecos, como a umidade e a temperatura do ambiente em que o filme está exposto também provoca mudanças nas propriedades de barreira, pois com o inchamento da matriz polimérica há um aumento na difusão das moléculas de água (PETRIKOSKI, 2013; ROCHA PLÁCIDO MOORE et al., 2006).

Os filmes de amido têm uma desvantagem aos filmes de polímeros convencionais por causa da sua natureza hidrofílica e sensibilidade a umidade e isso está ligado à sua alta permeabilidade aos vapores de água e fracas propriedades mecânicas (DOLE et al., 2004; WILHELM et al., 2003). Esses filmes de amido podem ser utilizados para embalagens de vegetais frescos, pois contém uma alta permeabilidade. Já para embalar produtos desidratados é indicado filmes com permeabilidade mais baixa (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

### **3.5.3 Propriedades ópticas**

Opacidade ou transparência, cor e brilho são parâmetros relacionados às propriedades ópticas. Porém, a cor é o parâmetro mais importante para a caracterização de um filme, pois está relacionado com a matéria prima utilizada como base de sua formulação (VICENTINI, 2003). Esta análise geralmente é medida com o auxílio de um colorímetro que envolve a determinação de parâmetros de cor CIE  $L^* a^* b^*$ , onde  $L^*$  mede a luminosidade de materiais variando de 0 (preto) a 100 (branco);  $a^*$  varia do verde (-) ao vermelho (+); e o  $b^*$  do azul (-) ao amarelo (+). Com os valores obtidos pode ser calculada a diferença de cor em comparação com um padrão ou com uma placa branca.

A transparência ou opacidade de um material é dada sobre o mínimo de absorção ou reflexão da incidência de luz que o atravessa. E a opacidade, é o oposto da transparência, onde o objeto absorve ou reflete toda a luz incidente, sem ocorrer a transmissão da luz (BOBBIO; BOBBIO, 1992). Esses parâmetros são avaliados através da transmitância interna do material, quanto maior for o valor de transmitância, maior é a transparência do filme, e assim, maior será a influência da luz sofre a oxidação e degradação do alimento revestido. A elaboração e utilização de filmes opacos, que contenham ingredientes que absorvam a luz no espectro UV-visível, são alternativas eficazes para evitar estas reações, neste caso, os antioxidantes são boas alternativas (SILVA-WEISS et al., 2013).

### **3.5.4 Propriedades mecânicas**

O material de embalagem deve possuir resistência mecânica suficiente para manter a integridade durante o manuseio e armazenamento. Estas propriedades incluem a resistência

à tração, percentual de alongação e módulo de elasticidade ou módulo de Young (WIHODO; MORARU, 2013).

As propriedades mecânicas de um filme dependem da composição do material e das condições extrínsecas. A adição de agentes plastificantes auxilia na mobilidade das cadeias poliméricas, levando ao aumento da alongação e diminuição da resistência à tração. A extensibilidade e resistência do filme pode ser aumentado com a incorporação de aditivos e lipídeos. Já a resistência do material está relacionada com a quantidade de polímero utilizado na solução filmogênica (GIMÉNEZ et al., 2009; VIEIRA et al., 2011b; WIHODO; MORARU, 2013).

As aplicações práticas dos filmes também são determinadas pelas características das propriedades estruturais que estão diretamente relacionadas as propriedades mecânicas e de barreira (HERNANDEZ-IZQUIERDO; KROCHTA, 2008).

### **3.5.5 Propriedades antioxidantes**

As reações de oxidação que ocorrem em presença de oxigênio constituem em um importante efeito deteriorante dos alimentos, principalmente em alimentos com alto teor de ácidos graxos poli-insaturados. A aplicação de embalagens ou filmes biodegradáveis com a incorporação de antioxidantes em sua formulação é uma alternativa para amenizar esse problema. Quanto maior for a barreira contra permeabilidade de oxigênio, maior é a redução das reações de oxidação nos produtos embalados (BERTON-CARABIN et al., 2013; BONILLA et al., 2012) .

Os filmes biodegradáveis com propriedades antioxidantes estão sendo fonte de vários estudos, pois as embalagens antioxidantes existentes no mercado atualmente, são compostas por agentes antioxidantes sintéticos e matrizes poliméricas não biodegradáveis. Porém, a incorporação de antioxidantes naturais em filmes biodegradáveis altera as propriedades mecânicas, térmicas e de barreira (SOUZA; SILVA; DRUZIAN, 2012).

Diversos compostos antioxidantes podem ser incorporados a matriz polimérica com o objetivo de inibir as reações de oxidação através do contato com a superfície do alimento. Estes compostos podem ser de origem sintética como o hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT) ou naturais proveniente de óleos essenciais, extrato ou

compostos bioativos isolados de plantas e vegetais (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013; NORAJIT; KIM; RYU, 2010).

Esta atividade pode ser medida por diferentes métodos de capturas de radicais, como de: radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), radical N-dietil-p-fenilenodiamina (DPD), poder redutor de íons ferro (FRAP), radical 2,2'-azinobis (3-etil-benzotiazolino-6-ácido sulfônico) (ABTS) e compostos fenólicos totais (BONILLA et al., 2012). Porém, estes métodos só avaliam a atividade antioxidante no filme, entretanto outras metodologias podem ser utilizadas para avaliar a ação dos filmes ativos empregados para proteção do alimento. Neste caso, um alimento gorduroso é embalado com o filme ativo, afim de prevenir ou retardar a oxidação lipídica, ficando em contato com o alimento, o filme pode ter ação antioxidante sobre o mesmo, a qual é averiguada realizando testes diretamente no alimento. Análises de índice de peróxidos, dienos e trienos podem ser feitas diretamente em óleos, e no caso de peixes gordurosos é necessário realizar a extração do óleo.

A determinação do índice de peróxidos é um dos métodos mais utilizados para avaliar a qualidade de óleos vegetais, pois sua medida indica um estágio de oxidação primária do óleo, podendo facilmente evoluir para outros estágios de rancificação (PIZARRO et al., 2013; YANG et al., 2014). A determinação de dienos e trienos verifica a presença de compostos primários e secundários de oxidação como hidroperóxidos, aldeídos, cetonas, entre outros. Em carnes, a análise mais utilizada é a de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), onde ocorre uma reação do malonaldeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBA).

O malonaldeído (MDA) é um composto tóxico formado a partir da oxidação lipídica. Inicialmente ocorre a formação dos radicais livres que reagem com o oxigênio formando peróxidos, os acúmulos desses peróxidos formam os hidroperóxidos que em decomposição alteram as características sensoriais do alimento, levando a formação do MDA. Além da luz, o oxigênio, a umidade, a temperatura, a composição nutricional e a carga microbiana também influenciam na oxidação lipídica dos peixes (COUTINHO, 2015; GÓMEZ-ESTACA et al., 2014).

Como a auto-oxidação dos alimentos ocorre mais lentamente em condições normais de armazenamento, a fim de diminuir custos e tempo, os testes são feitos em condições aceleradas fazendo uso de temperaturas mais altas, catalizadores metálicos e uso de luz direta (FARHOOSH, 2007).

### **3.5.6 Biodegradabilidade dos filmes**

A degradação é um processo de desintegração do material em pedaços muito pequenos, fazendo com que o polímero não seja mais visível, mas ainda permaneça no ambiente. Embalagens produzidas a partir do petróleo podem levar mais de cem anos para se degradar quando expostos à atmosfera e ainda mais tempo quando colocados em aterros. Por não serem absorvidos pela natureza estes polímeros causam grande acúmulo principalmente nos oceanos, que devido a correntes marítimas podem ser levados para locais distantes e contaminar animais aquáticos, levando a sua morte através da ingestão. Devido a isso, o maior acúmulo de lixo do mundo está localizado no oceano Pacífico, entre o Havaí e a Califórnia, com um tamanho de aproximadamente 680 mil quilômetros quadrados; 90 % deste lixo é composto por plásticos (MOORE, 2008).

Já a biodegradação é um processo que envolve microrganismos, como bactérias, fungos e algas, que consomem a substância como fonte alimentar, neste caso o produto desaparece completamente e é convertido em água, gás carbônico e biomassa em um período de tempo muito menor (ROBERTSON, 2016).

A técnica mais simples para avaliar a biodegradabilidade do material é enterrar o filme no solo, onde é exposto à microflora mista naturalmente presente no solo. Geralmente, os experimentos ocorrem em recipientes adicionados de solo com umidade constante, simulando o processo natural de biodegradabilidade. Os filmes de amido são visualmente biodegradáveis, já que o amido é utilizado como fonte de energia para os microrganismos do solo (MARAN et al., 2014).

### **3.6 Legislações**

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não descreve uma legislação específica para embalagens ou revestimentos comestíveis. Portanto, estes filmes são considerados ingredientes quando melhoram as qualidades nutricionais do alimento, ou aditivo se não influenciam no seu valor nutricional. Devido a isso, deve-se obedecer ao Decreto 55.871, de 26 de março de 1965, que relata as normas regulamentadoras de emprego de aditivos em alimentos, e à Portaria nº 540 – SVS/MS, de 27 de outubro de 1997 que trata sobre o Regulamento Técnico de Aditivo Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia de

Fabricação, além das legislações nacionais, deve-se considerar as referentes ao *Codex Alimentarius* e ao FDA (*Food and Drug Administration*) (ANVISA, 2008; VILLADIEGO et al., 2005).

Quanto a utilização de algas em alimentos, a ANVISA tem Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos que descreve recomendações de uso de produtos já aprovados pela comissão, dentre eles as algas marinhas, *Chlorella* e *Spirulina* (ANVISA, 2008).

Na Lista de Novos Alimentos aprovados, consta a utilização de algas marinhas, *Chlorella* e *Spirulina* na forma de capsulas, comprimidos e tabletes. Neste caso deve constar na rotulagem do alimento as informações seguintes: “Consumir preferencialmente sob orientação de médico ou nutricionista.”, “Este produto não é indicado para gestantes, nutrízes e crianças.” e “O consumo deste produto deve ser acompanhado da ingestão de água.”(ANVISA, 2008).

Para a *Spirulina* a recomendação diária de consumo não deve resultar na ingestão acima de 1,6 g. Produtos alimentícios com a aplicação da *Spirulina* devem obrigatoriamente serem registrados na Anvisa (ANVISA, 2008).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os cultivos de microalgas e os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioengenharia e no Laboratório de Compostos Bioativos, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

### 4.1 Microalgas

Neste trabalho foram utilizadas as microalgas *Heterochlorella luteoviridis* BE002 e *Dunaliella tertiolecta* BE003, do banco de algas do Laboratório de Bioengenharia, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

#### 4.1.1 Meios de cultivo para microalgas

Os meios de cultivo para a obtenção da biomassa de microalgas foram baseados no meio Guillard “f/2” com modificação na quantidade de  $\text{NaNO}_3$  para a *H. luteoviridis* e de  $\text{NaNO}_3$  e  $\text{NaCl}$  para *D. tertiolecta* (FRÉ et al., 2016; JAESCHKE et al., 2016).

O meio de cultivo foi preparado com a adição de 34 g de sal marinho (Red Sea) por litro de água, formando uma solução de água do mar artificial. Essa mistura foi esterilizada em autoclave (121 °C por 15 min) e as soluções estoque foram adicionadas posteriormente a fim de evitar degradação térmica e/ou precipitação. Para o meio de cultivo foram utilizadas as quantidades por litro apresentadas na Tabela 1:

**Tabela 1** – Composição Meio f/2 modificado.

Componentes	Composição de cultivo	
	<i>H. luteoviridis</i>	<i>D. tertiolecta</i>
Sal marinho (Red Sea)	34 g L <sup>-1</sup>	34 g L <sup>-1</sup>
$\text{NaNO}_3$ (Nitrato de Sódio)	650 mg L <sup>-1</sup>	450 mg L <sup>-1</sup>
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Fosfato de Sódio)	5 mg L <sup>-1</sup>	5 mg L <sup>-1</sup>
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Silicato de Sódio)	30 mg L <sup>-1</sup>	30 mg L <sup>-1</sup>
Cloreto de sódio (NaCl)	-	17 g L <sup>-1</sup>
Solução de Metais Traço	1 mL L <sup>-1</sup>	1 mL L <sup>-1</sup>
Solução de Vitaminas	1 mL L <sup>-1</sup>	1 mL L <sup>-1</sup>
Solução tampão de pH	1 mL L <sup>-1</sup>	1 mL L <sup>-1</sup>

A solução de metais-traço contém por litro: 9,8 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 22 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 180 mg de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 6,3 mg de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 4,36 g de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  e 3,15 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . A solução de vitaminas contém, por litro: 100 mg de tiamina, 0,5 mg de cianocobalamina e 0,5 mg de biotina. A solução tampão utilizada para manter o pH entre 7,5 e 8,5 foi feita com 50 g de TRIS (tris (hidroximetil) aminometano), aproximadamente 30 mL de ácido clorídrico e água destilada para um volume final de 200 mL.

Para a preparação das soluções foi utilizada água destilada esterilizada, em autoclave vertical CS (Prismatec) a 121 °C por 15 min. A solução de vitaminas foi esterilizada por microfiltração (Sartorius Stedim Biotech). As soluções foram misturadas e transferidas em capela de fluxo laminar (Labconco, Purifiertm Clean Bench) a temperatura ambiente.

#### 4.1.2 Pré-inóculo de microalgas

O pré-inóculo de microalga foi preparado em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, com 24 mL de cultura estoque da microalga e 216 mL de meio de cultivo estéril e mantido em incubadora (*Oxylab*, Brasil) com agitação orbital constante de 90 rpm, temperatura de 28 °C e luminosidade artificial totalizando 64 W (aproximadamente 2,5 klx) pelo período de 7 dias (Figura 3). Passado esse período, o conteúdo de cada frasco foi transferido e homogeneizado em um frasco estéril maior, com o objetivo de padronizar os pré-inóculos que podem crescer em taxas diferentes na estufa rotatória.

Após esse período, as amostras foram dispostas em 8 fotobiorreatores, conforme descrito a seguir.



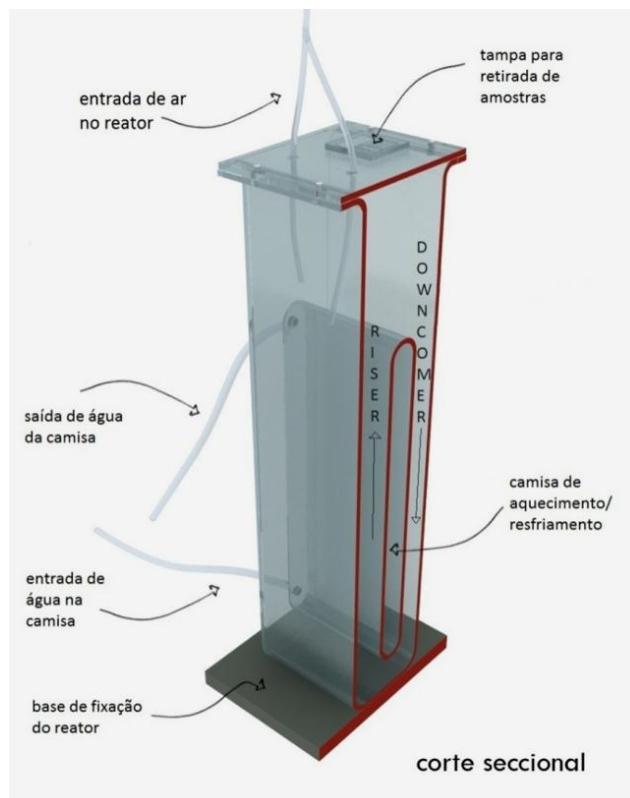
**Figura 3** – Incubadora com agitação orbital contendo os pré-inóculos das microalgas.



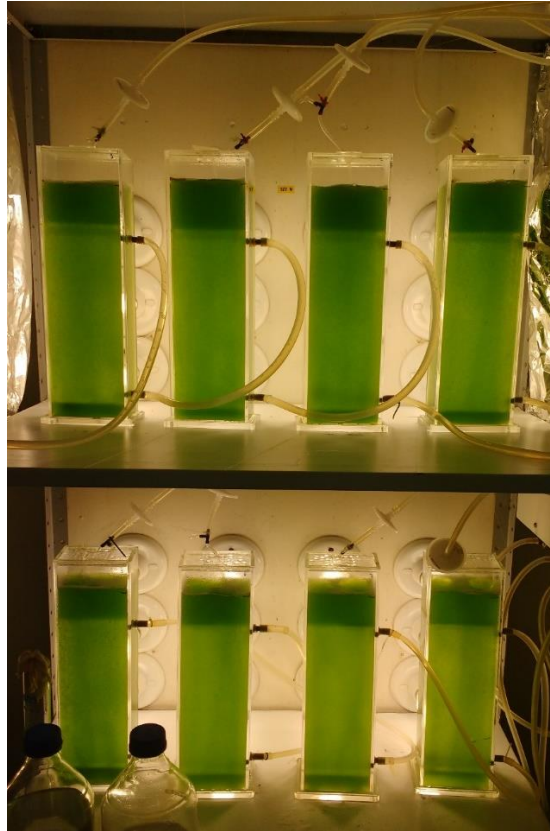
### 4.1.3 Cultivo em fotobiorreatores

Os fotobiorreatores utilizados para os cultivos são de acrílico do tipo *air-lift*, com volume útil de 2,4 L, providos de camisa interna de aquecimento/resfriamento conectada a banho térmico (Haake DC 30) e mantidas a 28 °C para o cultivo (Figura 4 e Figura 5). Os fotobiorreatores foram desenvolvidos no Laboratório de Bioengenharia (117) e mais detalhes sobre o projeto e funcionamento podem ser encontrados em Kochem *et al.* (2014).

Primeiramente foi feita a assepsia dos fotobiorreatores. Cada biorreator foi preenchido com 10 mL de solução comercial de hipoclorito de sódio e completados com água, permanecendo em repouso por 15 min, passado esse período foi feita a neutralização do cloro ativo com 2,5 mL de solução de tiosulfato de sódio 250 g L<sup>-1</sup> P.A.. Após 2 h cada fotobiorreator foi esvaziado para posterior recebimento de 240 mL de pré-inóculo e de 2 160 mL de meio de cultivo (ANDERSEN, 2005).



**Figura 4** – Desenho 3D do fotobiorreator de 2,4 L (KOCHEM et al., 2014).



**Figura 5** – Série de 8 Fotobiorreatores utilizados para o cultivo.

A iluminação foi realizada através de um painel com lâmpadas eletrônicas de 30 W disposto atrás dos fotobiorreatores com luminosidade de 18,0 klx, medida na parede do fotobiorreator por luxímetro digital (MS6610 da Akso).

A aeração foi realizada com vazão de 0,5 L min<sup>-1</sup> de ar enriquecido com CO<sub>2</sub> para a *H. luteoviridis* e CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub> para *D. tertiolecta*, filtrados com membrana de 0,22 µm Midisart®2000 (Sartorius Stedim Biotech), controlados por rotâmetro e utilizando-se duas pedras porosas conectadas em mangueiras inseridas pelo topo dos reatores até o fundo dos mesmos.

Os cultivos duraram 15 dias, diariamente foram feitos os seguintes procedimentos: leituras de pH através de fita de pH Alkalit® (Merck), adição de 2,4 mL de solução estoque de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 2,4 mL de solução estoque de metais traço, adição de água destilada para acertar o nível de 2,4 L quando o mesmo baixava por evaporação. Ao final do cultivo o conteúdo dos fotobiorreatores foi centrifugado a 10000 × *g* por 10 min para ocorrer a separação da biomassa do meio de cultivo. O meio de cultivo foi descartado e a biomassa liofilizada à temperatura de -40 °C por 48 h para a obtenção da biomassa seca que foi utilizada na formulação dos filmes.

#### 4.1.4 Obtenção do extrato de microalgas

O extrato foi obtido através de extração alcoólica com etanol absoluto, para tanto a biomassa seca foi hidratada com água destilada permanecendo em repouso por aproximadamente 24 h em temperatura de refrigeração. Após, a biomassa hidratada foi macerada com a adição de etanol absoluto e centrifugada a  $3000 \times g$  por 10 min. O sobrenadante foi separado e o precipitado voltou novamente para a etapa de maceração seguindo o mesmo processo. A repetição do processo foi realizada até a obtenção de uma biomassa branca.

Após o processo de extração, o solvente foi separado em um rota-evaporador (Fisaton 802) com rotação de aproximadamente 70 rpm e temperatura de 30 °C. O extrato ainda passou pelo processo de liofilização a temperatura de -40 °C por 48 h para retirada total da água presente.

O rendimento do extrato foi calculado a partir da biomassa inicial com auxílio da Equação (1):

$$\text{Rendimento extrato (\%)} = \frac{\text{Massa extrato final (g)}}{\text{Massa biomassa inicial (g)}} \times 100 \quad (1)$$

#### 4.2 Elaboração dos filmes

A elaboração e análise dos filmes foram feitas no Laboratório de Compostos Bioativos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) e para a formulação dos filmes foi utilizado amido de mandioca da marca comercial Yoki, plastificante glicerol e água. As microalgas aplicadas nos filmes foram cultivadas conforme descrito anteriormente.

Todos os filmes foram obtidos pelo método de *casting*. Vários testes preliminares foram feitos para definir as quantidades dos ingredientes utilizados. Baseado em testes anteriores foram fixadas as porcentagens de amido de mandioca e plastificante, para as concentrações de biomassa das microalgas foram feitos testes com diferentes quantidades para definir as mais relevantes para as análises posteriores. O tempo e temperatura de

secagem também foram avaliadas anteriormente, utilizando diferentes combinações tempo/temperatura até chegar a um binômio ideal.

Para o preparo dos filmes com a biomassa, a solução filmogênica foi preparada com uma suspensão de 4 % de amido de mandioca (4 g de amido para 100 g de solução) e mantido em banho-maria com agitação mecânica por 15 min a 80 °C para completa gelatinização. Em seguida, a solução foi resfriada até 40 °C, e foram adicionados o plastificante (glicerol, 1 % m/m solução filmogênica) e a biomassa seca, nas concentrações de 0 % (controle CB) e 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % (m/m) das microalgas *H. luteoviridis* (BH) ou *D. tertiolecta* (BD) mantendo a homogeneização por mais 30 min.

Para os filmes com os extratos *H. luteoviridis* (EH) ou *D. tertiolecta* (ED) também foi preparada uma solução filmogênica com uma suspensão de 4 % de amido de mandioca (4 g de amido para 100 g de solução) e mantido em banho-maria com agitação por 15 min a 80 °C para completa gelatinização. Em seguida, a solução foi resfriada até 40 °C, e foram adicionados o plastificante (glicerol, 1 % m/m solução filmogênica), o polissorbato 80 (Tween 80, 0,1 % m/m solução filmogênica), foi utilizado para auxiliar na homogeneização entre o extrato e a solução filmogênica, e o extrato, nas concentrações de 0 % (controle CE) e 0,12 %, 0,25 % e 0,5 % (p/p) das microalgas *H. luteoviridis* ou *D. tertiolecta* mantendo a homogeneização por mais 30 min.

Para os filmes com extrato (EH e ED), as quantidades de 0,12 %, 0,25 % e 0,5 % adicionadas foram calculadas com auxílio da Equação (2) equivalentes ao rendimento do extrato de ambas as microalgas que foi de 25 %.

$$Extrato (\%) = \frac{Biomassa (\%) \times Rendimento Extrato (\%)}{100} \quad (2)$$

Cada formulação foi vertida uniformemente em placas de acrílico, na quantidade de 0,25 g/cm<sup>2</sup> por placa e secas em estufa com circulação forçada de ar (DeLeo, B5AFD, Brasil) a 35 °C por 16 h.

Após a secagem os filmes foram mantidos em dessecador com umidade relativa controlada (58 %, 25 °C) por 48 h. Então, os filmes foram retirados das placas e preparados para as análises de caracterização através de propriedades mecânicas, físico-químicas, de

barreira e ópticas, além da avaliação da proteção contra a oxidação lipídica e a biodegradabilidade.

### 4.3 Caracterização dos filmes

#### 4.3.1 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas de resistência à tração, alongação na ruptura e módulo de Young foram determinadas utilizando um texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems, Reino Unido) (Figura 6), de acordo com o método padrão ASTM D882-12, a temperatura de 25 °C, separação inicial das garras de 50 mm e velocidade do *probe* de 0,8 mm s<sup>-1</sup> (ASTM, 2012).

Os filmes foram recortados com o auxílio de um estilete formando 10 corpos de prova de cada formulação com 80 mm de comprimento e 10 mm de largura e foram condicionados por dois dias à temperatura ambiente e umidade relativa de 58 % antes da medição.



**Figura 6** – Texturômetro utilizado nas análises de propriedades mecânicas.

#### 4.3.2 Propriedades físico-químicas

##### 4.3.2.1 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada utilizando-se um micrometro digital (modelo IP40, Digimess, Brasil) com escala de 0 mm a 25 mm e precisão de 0,001 mm (Figura 7). Os valores apresentados representam a média de 5 medidas feitas aleatoriamente ao longo de cada amostra avaliada.



**Figura 7**– Micrômetro Digital usado para a análise de espessura.

#### **4.3.2.2 Umidade**

O conteúdo de umidade foi determinado de acordo com a AOAC (2005), através de método gravimétrico. Discos de 2 cm de diâmetro foram cortados e pesados em recipientes metálicos previamente tarados. Foi utilizada estufa com circulação e renovação de ar (modelo TE-394/2, Tecnal, Brasil) a 105 °C onde as capsulas foram mantidas na estufa até massa constante (base seca), por 24 h.

#### **4.3.2.3 Solubilidade em água**

Essa análise foi realizada sequencialmente após a avaliação da umidade, devido a necessidade de a amostra estar isenta de umidade. A solubilidade em água dos filmes foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Colla et al. (2006) com modificações. A análise foi realizada em triplicata, onde as amostras dos filmes retirados da análise de umidade foram pesadas, novamente acondicionadas em recipientes metálicos e adicionadas 30 mL de água destilada e mantidas em agitação lenta por 24 h a 25 °C (modelo NT145, Novatecnica, Brasil). Após este período, a água do recipiente foi retirada e filtrada, a fim de, averiguar a presença de fragmentos de filme solúveis em água. O filtro utilizado foi pesado antes e depois de secagem (105 °C por 24 horas), e a diferença de massa foi utilizada no cálculo da solubilidade. Os recipientes com as amostras sem água foram, novamente, submetidos à secagem a 105 °C por 24 h, sendo pesados antes e após a desidratação do filme para

determinar a massa da matéria seca que não se dissolveu em água. A solubilidade foi calculada usando a Equação (3):

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{w_i - w_f}{w_i} \times 100 \quad (3)$$

onde  $w_i$  é a massa seca inicial da amostra (g) e  $w_f$  é a massa seca final da amostra (g) após ter permanecido 24 h sob agitação nas cápsulas com 30 mL de água destilada.

#### 4.3.3 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) das amostras foi determinada em triplicata baseada no método gravimétrico padrão ASTM E96-05 (ASTM, 2005) e no procedimento descrito por Talja *et al.* (2008) com modificações.

As amostras foram colocadas em células de permeabilidade de alumínio (diâmetro interno 63 mm, altura 25 mm) contendo 1,5 g de  $\text{CaCl}_2$  anidro granular e hermeticamente seladas e acondicionadas em câmara de vidro contendo solução de NaCl saturado para se obter 75 % de umidade relativa a 25 °C, por 24 h (Figura 8). Após cada célula foi pesada em balança analítica (modelo AY, Shimadzu, Japão).

A permeabilidade ao vapor de água das amostras (PVA) foi determinada, de acordo com a Equação (4):

$$PVA = \frac{w \times L}{A \times t \times \Delta p} \quad (4)$$

onde  $w$  é a massa de água permeada através do filme (g),  $L$  é a espessura do filme (mm),  $A$  é a área de permeação ( $\text{m}^2$ ),  $t$  é o tempo de permeação (h), e  $\Delta p$  é a diferença de pressão de vapor entre os dois lados do filme (Pa ou kPa).



**Figura 8** – Cuba de vidro com as células de alumínio para análise de PVA.

#### 4.3.4 Propriedades óticas

##### 4.3.4.1 Cor

A cor dos filmes foi determinada através de colorímetro (modelo CR-300, MinoltaCo. Ltd, Japão) (Figura 9) operando a luz do dia com D65. Os parâmetros de cor CIE foram dados por  $L^*a^*b^*$ , onde  $L^*$  representa a luminosidade, variando de 0 (preto) a 100 (branco);  $a^*$ , varia do verde (-) ao vermelho (+); e  $b^*$ , do azul (-) ao amarelo (+). Um disco branco ( $L_0^*$ : 97,5;  $a_0^*$ : 0,13 e  $b_0^*$ : 1,7) foi usado como padrão. A diferença de cor em comparação ao branco ( $\Delta E$ ) foi calculada pela Equação (5):

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

onde  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$   $\Delta b^*$  representam as diferenças entre os parâmetros de cor do filme e um disco branco padrão.





**Figura 9** – Colorímetro (modelo CR-300, MinoltaCo. Ltd, Japão) utilizado para determinar a cor dos filmes.

#### **4.3.4.2 Opacidade**

A opacidade foi determinada pela medida da absorbância dos filmes em espectrofotômetro (modelo UV-1800, Shimadzu, Japão). Para uma visão geral do comportamento dos filmes, os mesmos foram submetidos a uma varredura nos comprimentos de onda entre 200 nm (região UV) e 700 nm (região visível). Os filmes foram cortados em um retângulo (4 cm × 1 cm), alojados diretamente na cubeta de quartzo de teste do equipamento e uma cubeta vazia foi utilizada como referência e branco.

A transparência no comprimento de onda de 600 nm ou a fração de luz incidente nesse comprimento específico foi utilizada para o cálculo de opacidade, utilizando a Equação (6).

$$\text{Opacidade (A/mm)} = (-\log T_{600})/x \quad (6)$$

onde  $T_{600}$  é a transmitância fracional a 600 nm, e  $x$  é a espessura do filme (mm).

#### **4.3.5 Atividade antioxidante pelo método de oxidação lipídica**

A atividade antioxidante dos filmes foi medida pelo método de oxidação lipídica como descrito por Colin-Chavéz et al. (2013). Para isso, os filmes foram cortados, dobrados e selados (Modelo F 200 Flash, Fastvac, São Paulo, Brasil), em ambas as extremidades. A parte superior foi mantida aberta até que 8 g de óleo de girassol sem antioxidantes artificiais foi adicionado (Figura 10). Como controle o óleo de girassol foi embalado em garrafas de plástico fechadas, usualmente utilizadas para a comercialização do óleo, (PLA) chamado de controle fechado, colocado em placas de Petri de vidro aberto (VID) chamado de controle aberto, em embalagem de PEAD, chamado de controle plástico e em filme de amido sem a adição de

microalga, CB como controle para filmes com biomassa e CE como controle para filmes com extrato, nos filmes contendo biomassa (BH 0,5, BH 1,0, BH 2,0, BD 0,5, BD 1,0 e BD 2,0) e nos filmes contendo extrato de microalga (EH 0,5, EH 1,0, EH 2,0, ED 0,5, ED 1,0 e ED 2,0). As amostras e os controles foram mantidos por 9 dias sob condições aceleradas, à temperatura de  $35 \pm 2$  °C, 34 % UR e expostos à luz fluorescente com uma intensidade de 900-1000 lx (MS6610 da Akso). Amostras de óleo foram coletadas após 3, 6 e 9 dias de experimento para determinar o índice de peróxidos (IP) de acordo com metodologia da AOCS (1993). Os resultados foram expressos em miliequivalentes de oxigênio por quilograma de óleo (mEq  $\text{kg}^{-1}$ ) e comparados com o padrão de *Codex Alimentarius*, que estabelece valor inferior a 10 mEq  $\text{kg}^{-1}$  para amostras de óleo fresco. A concentração de peróxidos (mEq  $\text{kg}^{-1}$ ) foi calculada através da Equação (7):

$$I.P. = \frac{(A + B) \times N \times 1000 \times fc}{P} \quad (7)$$

onde  $A$  é o volume da titulação da amostra;  $B$  é o volume da titulação do branco;  $N$ , normalidade do tiossulfato;  $fc$  é o fator de correção e  $P$  (g) é a massa da amostra.



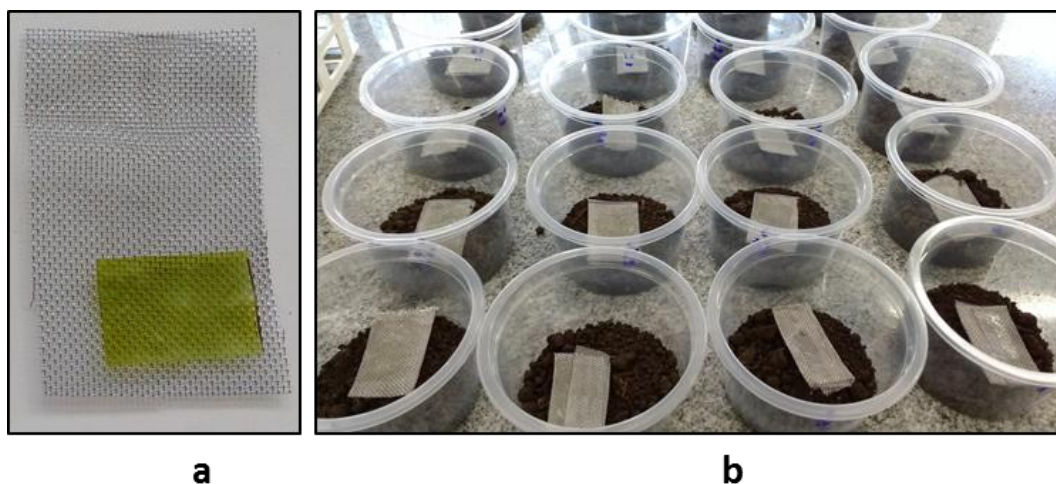
**Figura 10** – Óleo de girassol embalado nos filmes biodegradáveis para análise de índice de peróxidos.

#### 4.3.6 Biodegradabilidade dos filmes

A avaliação da biodegradabilidade dos filmes foi realizada de acordo com metodologia descrita por Martucci e Ruseckaite (2009) com algumas adaptações. Esse método é baseado

na avaliação da biodegradação dos filmes quando os mesmos são enterrados e expostos à microbiota natural encontrada no solo. Para isso, potes plásticos foram adicionadas de solo orgânico natural (pH aproximadamente 7,2) empregado como meio para degradação dos filmes.

Os filmes foram cortados em retângulos de 2 cm × 3 cm e desidratadas a 60 °C em estufa (modelo TLK48, DeLeo, Brasil) até massa constante. Em seguida, eles foram acondicionados em pedaços de malha de alumínio (previamente secas e pesadas) a fim de garantir o contato entre o filme e o solo e facilitar a sua retirada após o período de estudo (Figura 11). As malhas contendo as amostras foram dobradas, colocadas a uma profundidade de 4 cm a partir da superfície do recipiente e cobertas pelo solo para mantê-las enterradas. Água foi adicionada ao solo a cada dois dias para manter a unidade a cerca de 40 %.



**Figura 11** – (a) Amostra de filme biodegradável sobre malha de alumínio. (b) Recipientes plásticos com solo e as malhas de alumínio contendo os filmes.

O experimento foi conduzido em duplicata e os filmes foram avaliados em intervalos específicos (t): antes de serem enterrados e após 5, 10 e 15 dias nas condições previamente descritas. Após cada período de tempo estabelecido, o conjunto malha e filme foi desenterrado e retirado do contato com o solo com o auxílio de uma pinça. Os conjuntos foram cuidadosamente lavados com água destilada para retirar resquícios de terra e superficialmente secos com a ajuda de papel filtro. Em seguida, foram submetidos à secagem a 60 °C (modelo TLK48, DeLeo, Brasil) até massa constante. O grau de biodegradação das películas foi determinado como a perda de massa (WL;%), pela Equação (8):

$$WL(\%) = [(m_t - m_o)/m_o] \times 100$$

onde  $m_o$  é a massa inicial da amostra seca de filme e  $m_t$  é a massa seca remanescente no tempo  $t$ .

#### **4.4 Determinação de atividade enzimática**

##### **4.4.1 Determinação qualitativa de amilase**

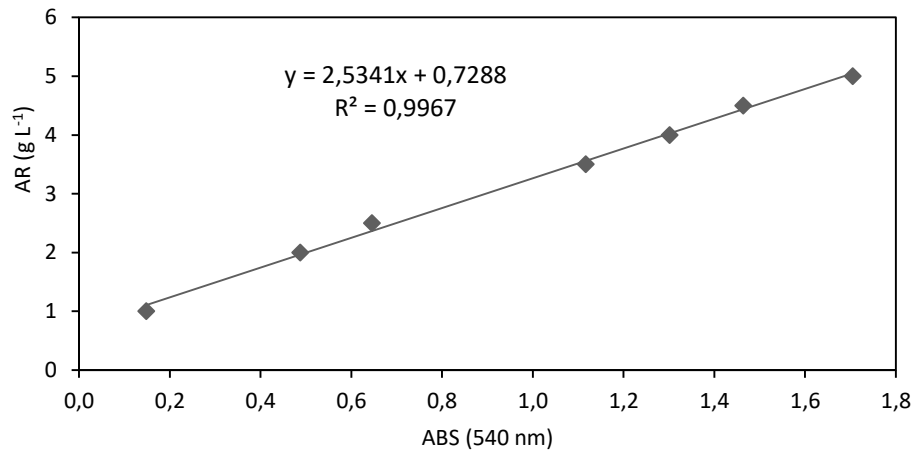
Para determinar a atividade amilolítica, as biomassas de microalgas foram inoculadas em um orifício do meio de cultura Ágar acrescido de 1 % de amido (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). As placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas. Passado esse período, foram acrescentados 5 mL de solução Lugol e as placas foram lavadas quase imediatamente com água destilada.

##### **4.4.2 Determinação quantitativa pelo método de DNS**

Esta análise baseia-se na reação entre o açúcar redutor e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS, cor amarelo forte), que age como agente oxidante, o qual se reduz a um composto de cor laranja-marrom forte (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico) diante de açúcares redutores, onde o composto pode ser detectado por espectrofotometria a 540 nm (MILLER, 1959).

Foram analisadas amostras contendo somente a biomassa das microalgas e também as soluções filmogênicas com 1,0 % de biomassa e extrato de biomassa das algas *Heterochlorella luteoviridis* e *Dunaliella tertiolecta*.

Para cada amostra o preparo foi feito pesando 10 g de amostra e 50 mL de água destilada e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min. Após 100 µL do sobrenadante foi pipetada para um tubo de ensaio e adicionada 1,0 mL do reagente DNS (300 g L<sup>-1</sup> de tartarato duplo de sódio e potássio tetrahidratado (KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>.4H<sub>2</sub>O), 1 g/L de DNS e 16 g/L de hidróxido de sódio (NaOH 2N)). Agitou-se e aqueceu em banho maria a 100 °C (em ebulição) por 15 min. Após foi resfriado em banho de gelo e se fez a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm. Uma curva padrão (Figura 12) foi obtida a partir da absorbância relacionada as concentrações conhecidas de glicose (1 a 5 g L<sup>-1</sup>), calculando a concentração de açúcar redutor em % (m/m) através da equação da reta.

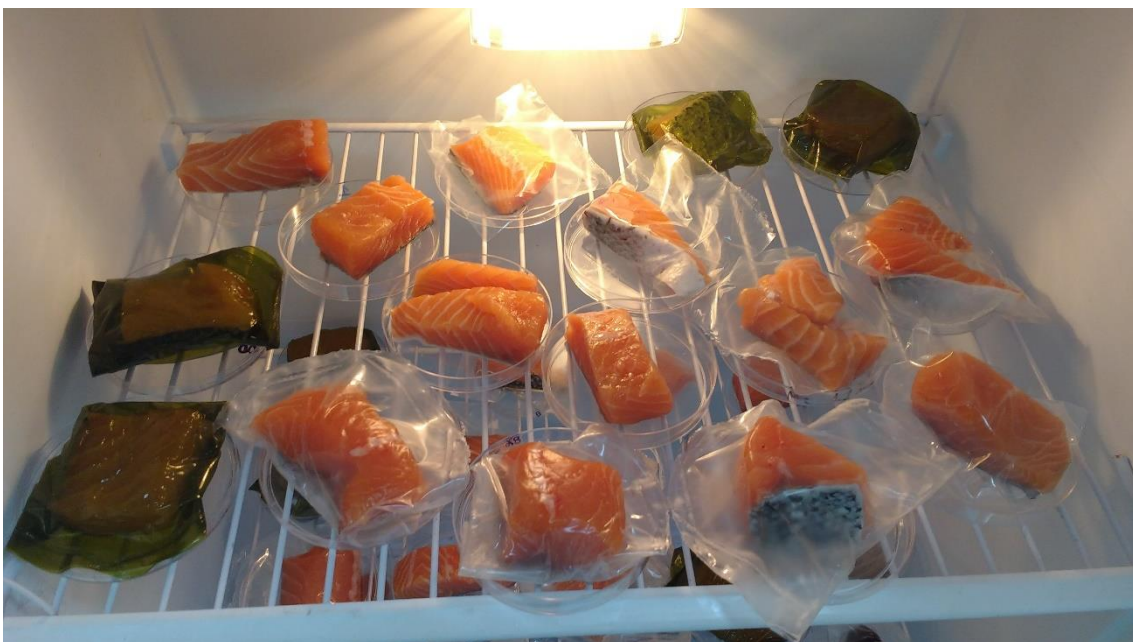


**Figura 12** – Curva padrão de açúcar redutor (AR) em g/L.

#### 4.5 Aplicação do filme em salmão

O filé de salmão utilizado nos testes foi adquirido no mercado público de Porto Alegre.

Amostras de filé de salmão fresco foram colocados em placas de Petri de vidro aberto (VID), chamado de controle aberto, em embalagem de PEAD, chamado de controle plástico, em filme de amido sem a adição de microalga CE como controle para filmes com extrato e no filme EH 2,0. As amostras foram mantidas por 6 dias a  $6 \pm 2$  °C, 34 % UR e expostos à luz fluorescente com uma intensidade de 900-1000 lux (MS6610 da Akso) (Figura 13). As análises do salmão foram realizadas nos dias 0, 2, 4 e 6.



**Figura 13** – Amostras de salmão embalados para análise da atividade antioxidante.

#### **4.5.1 Umidade do salmão**

O conteúdo de umidade das amostras de peixe foi determinado de acordo com a AOAC (2005), através de método gravimétrico. Onde aproximadamente 5 g de amostra foi pesada em cadinho de porcelana previamente identificados e tarados. Foi utilizada estufa com circulação e renovação de ar (modelo TE-394/2, Tecnal, Brasil) a 105 °C e os cadinhos foram mantidas na estufa até massa constante (base seca), por 24 h.

#### **4.5.2 Obtenção do óleo**

A extração do óleo de salmão foi realizada segundo a metodologia de Bligh e Dyer (1959) modificada, onde cerca de 100 g da amostra úmida e triturada foi homogeneizada como 100 mL de clorofórmio e 200 mL de metanol em béquer com agitação por aproximadamente 15 min. Logo após, a mistura foi filtrada a vácuo e o resíduo foi homogeneizado com 100 mL de clorofórmio e filtrado novamente. O filtrado foi transferido para um funil de separação e adicionado 100 mL de solução aquosa de cloreto de potássio ( $\text{KCl}$  8,8 g  $\text{L}^{-1}$ ). A solução permaneceu no funil de separação até completa separação das fases (Figura 14). A fase inferior foi filtrada em filtro de papel contendo sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) para a remoção da umidade. Os solventes foram eliminados em um rota- evaporador (Fisaton 802) com rotação de aproximadamente 60 rpm e temperatura de 10 °C.



**Figura 14** – Etapa de separação das fases dos solventes.

#### 4.5.3 Percentual de lipídios

Uma alíquota de exatamente 5 mL da solução obtida anteriormente a evaporação do solvente foi transferida para bquer de 50 mL previamente tarado. Os béqueres foram colocados em estufa com temperatura de 105 °C e permaneceram durante 2 h, até completa evaporação do solvente e água. Em seguida, os béqueres foram resfriados em dessecador a vácuo até temperatura ambiente e pesados em balança analítica. A porcentagem de lipídeos foi calculada pela Equação (9):

$$\% \text{ Lipídios} = ((\Delta m \times 20)/m) \times 100 \quad (9)$$

onde  $\Delta m$  (g) é a diferença de massa final e inicial do bquer; e  $m$  (g) é a massa da amostra inicial.

#### 4.5.4 Índice de peróxidos, dienos e trienos do óleo

O índice de peróxidos (I.P.) foi determinado segundo o método AOCS Cd-8-53 (AOCS, 1993) modificado: onde 1 g de óleo foi dissolvido em 20 mL de solução de ácido acético/clorofórmio (3:2, em volume) e 0,5 mL de solução saturada de KI. Após 1 min em repouso no escuro absoluto, adicionou-se 10 mL de água destilada sob agitação lenta, e em seguida acrescentou-se 1 mL de solução indicadora de amido a 1 %. Após isso, foi feita a titulação com solução padronizada de tiosulfato ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 0,01 N. A concentração de peróxidos ( $\text{mEq kg}^{-1}$ ) foi calculada através da Equação (7).

A determinação de dienos e trienos, no qual é verificada a presença de compostos primários e secundários da oxidação, como hidroperóxidos, aldeídos, cetonas, entre outros, foi analisada conforme a metodologia de Regulação Europeia EC 2568/91. Na análise, os dienos foram calculados a partir da absorção a 232 nm e os trienos a 276 nm, de uma solução de óleo a 1 % (em volume) em iso-octano (grau HPLC), em cubeta de quartzo com 1 cm, medido em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Japão).

Os resultados foram calculados através da Equação (10):

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \cdot s} \quad (10)$$

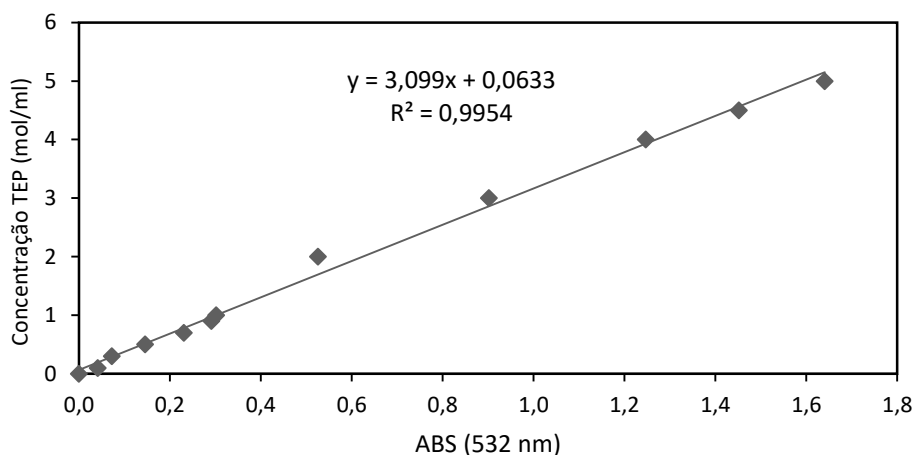
onde  $K_{\lambda}$  é a extinção específica no comprimento de onda,  $E_{\lambda}$  é a extinção medida no comprimento de onda  $\lambda$ ,  $c$  concentração da solução em g/100 ml e  $s$  caminho óptico da cubeta em cm.

#### 4.5.5 Índice de substancias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

As medidas de ácido tiobarbitúrico foram determinadas segundo a metodologia de Vyncke (1970) com modificações. No dia da análise, 5 g de peixe foram misturados com 10 mL de ácido tricloroacético (TCA) (7,5 % em água destilada), em seguida a mistura foi filtrada, usando papel filtro, transferido para um balão de 10 mL e o volume foi completado com TCA 7,5 %. Uma alíquota de 5 mL do filtrado foi misturada com 5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,02 M em tubos de ensaio com tampa e aquecidos em banho maria a 100 °C por 30 min. Em seguida foram resfriados e realizada a leitura em espectrofotômetro a 538 nm. Para o branco foi adicionado 5 mL de TCA 7,5 % e 5 mL de TBA 0,02 M e realizado paralelamente ao ensaio.



A curva padrão (Figura 15) foi construída a partir da solução estoque de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) ( $1 \times 10^{-3}$  M em água destilada), alíquotas de 0,1 a 5 mL da solução foram transferidas para tubos de ensaio e adicionadas o volume necessário de TCA 7,5 % para completar os 5 mL em todos os tubos, em seguida, 5 mL da solução TBA 0,02 M foi adicionada em cada tubo e aquecidos em banho maria a 100 °C por 30 min. Em seguida foram resfriados e realizada a leitura em espectrofotômetro a 532 nm.



**Figura 15** – Curva padrão de ácido tiobarbitúrico (TBA) com 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP).

#### 4.6 Análise dos resultados

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram submetidos à análise de comparação de médias de variância e teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade, seguida de uma análise de componentes principais (ACP) utilizando o software Statistica 12.0 (Statsoft Inc, São Paulo, Brasil).



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a obtenção de uma maior quantidade de biomassa os cultivos das microalgas foram mantidos nas condições descritas e com pH entre 7,5 e 8,5 controlado pela injeção de CO<sub>2</sub>.

Para a produção de filmes foram utilizadas as biomassas liofilizada e os extratos obtidos a partir das biomassas que renderam aproximadamente 25 % (m/m) a partir da biomassa de ambas as microalgas.

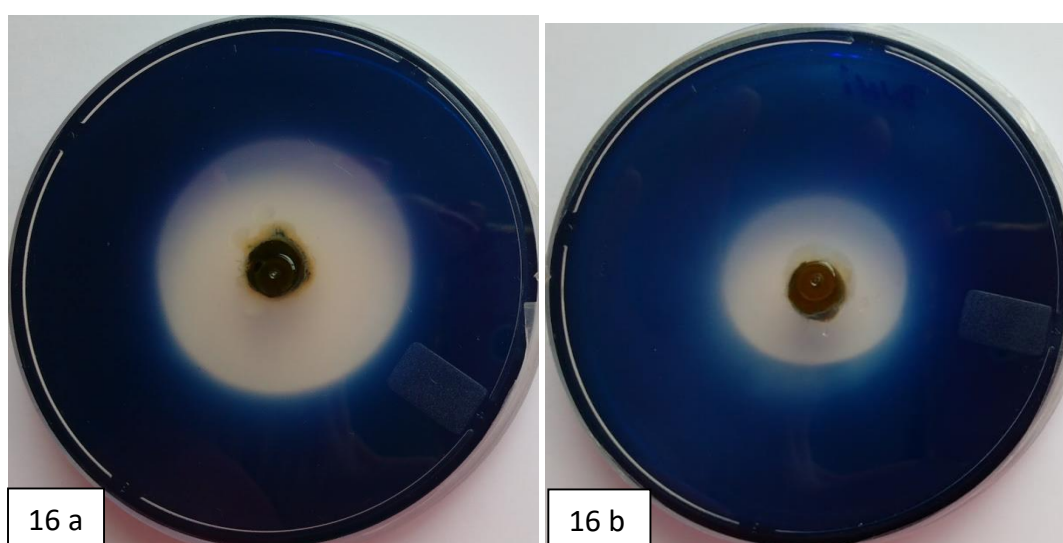
### 5.1 Caracterização dos filmes

As análises de umidade, permeabilidade ao vapor de água e solubilidade são muito importantes, pois é através dessas análises que se define uma finalidade de aplicação dos filmes. Em geral, os valores devem ser tão baixos quanto possível para reduzir a transferência de umidade entre o alimento e o meio externo mantendo uma integridade do alimento. Vários fatores influenciam esses parâmetros, dentre eles está o tipo de polímero utilizado, a integridade da matriz polimérica e os tipos de interações que ocorrem entre a matriz e os demais componentes da formulação, o plastificante e as condições do processamento. Ainda fatores como solubilidade, umidade, espessura, do filme podem influenciar na sua permeabilidade ao vapor de água.

Os filmes contendo extrato apresentam valores de umidade, PVA e solubilidade menores do que os filmes contendo biomassa (Tabela 2). Esses resultados podem estar relacionados com a diminuição dos compostos hidrofílicos causados pela presença da biomassa das microalgas. Nos filmes com extrato, os lipídios presentes, por terem características hidrofóbicas, podem ter causado uma diminuição nas interações água-amido auxiliando nos resultados. Outro fator a ser levado em conta é a utilização do *Tween 80* nas formulações contendo o extrato. Esses emulsificantes fortalece a rede de amido, diminuindo a tensão interfacial entre os lipídios e a fase aquosa e auxiliando na diminuição da retrogradação do amido. Isso pode explicar os resultados obtidos nos filmes controle CB e CE, onde tiveram diferenças significativas para as análises de umidade e PVA.

As formulações EH tiveram os menores valores de umidade e de PVA, diferenciando-se estatisticamente das demais formulações. Já para a análise de solubilidade os filmes EH e ED foram os que obtiveram os menores valores, se diferenciando estatisticamente das demais formulações.

A alta solubilidade dos filmes com biomassa pode ser explicada através da análise de açúcares redutores dos filmes. Para avaliar o efeito das microalgas frente as ligações do amido, foi realizada uma análise para verificar a presença de amilase nas microalgas, na Figura 16 são apresentadas as análises visuais do teste qualitativo. A presença de um halo claro em torno da aplicação das biomassas indicou a presença de amilase.



**Figura 16** – Análise quantitativa da ação enzimática da amilase após a coloração com a solução Lugol. (a) *H. luteoviridis* e (b) *D. tertiolecta*.

Para quantificar a ação da amilase foi realizada a análise de açúcares redutores utilizando o método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Os resultados obtidos foram de 0,87 g/L de açúcares redutores para a solução contendo apenas água e amido de mandioca e de 13,10 g/L e 8,32g/L para formulações BH 1,0 e BD 1,0 respectivamente, e de 1,34 g/L e 2,10 g/L para os filmes EH 1,0 e ED 1,0 respectivamente. Estes resultados demonstram que a adição da biomassa das microalgas provocou hidrólise nas ligações glicosídicas do amido, explicando os resultados obtidos nas análises de solubilidade e umidade serem mais altos para aos filmes contendo biomassa.

Filmes*	Umidade (%)	Solubilidade (%)	PVA (g mm/ h m <sup>2</sup> kPa)	E (mm)	RT (MPa)	ER (%)	MY (MPa)
PEAD	-	-	0,003 ± 0,0 <sup>i</sup>	0,054 ± 0,001 <sup>i</sup>	11,23 ± 0,23 <sup>b</sup>	388,47 ± 5,96 <sup>a</sup>	180,61 ± 15,9 <sup>c</sup>
CB	91,73 ± 0,51 <sup>ab</sup>	27,81 ± 0,73 <sup>d</sup>	0,345 ± 0,017 <sup>bc</sup>	0,064 ± 0,002 <sup>h</sup>	5,09 ± 0,19 <sup>d</sup>	20,24 ± 2,44 <sup>ef</sup>	110,05 ± 5,07 <sup>d</sup>
BH 0,5	89,51 ± 0,99 <sup>abcd</sup>	97,45 ± 1,71 <sup>a</sup>	0,437 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,071 ± 0,002 <sup>g</sup>	2,44 ± 0,35 <sup>f</sup>	11,17 ± 0,61 <sup>fg</sup>	55,02 ± 18,6 <sup>ef</sup>
BH 1,0	91,66 ± 0,37 <sup>abc</sup>	96,49 ± 2,05 <sup>a</sup>	0,286 ± 0,005 <sup>ef</sup>	0,095 ± 0,005 <sup>bc</sup>	1,13 ± 0,26 <sup>g</sup>	21,13 ± 3,33 <sup>ef</sup>	35,14 ± 11,4 <sup>efg</sup>
BH 2,0	89,11 ± 0,52 <sup>cde</sup>	86,53 ± 1,64 <sup>b</sup>	0,376 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,099 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,18 <sup>g</sup>	31,42 ± 1,69 <sup>de</sup>	9,08 ± 5,05 <sup>g</sup>
BD 0,5	91,91 ± 1,12 <sup>a</sup>	96,06 ± 0,62 <sup>a</sup>	0,309 ± 0,004 <sup>def</sup>	0,084 ± 0,003 <sup>e</sup>	3,29 ± 0,25 <sup>ed</sup>	19,61 ± 2,05 <sup>f</sup>	115,28 ± 13,4 <sup>d</sup>
BD 1,0	89,30 ± 0,47 <sup>bcd</sup>	94,63 ± 2,50 <sup>a</sup>	0,282 ± 0,01 <sup>ef</sup>	0,090 ± 0,004 <sup>d</sup>	0,61 ± 0,11 <sup>g</sup>	31,73 ± 0,87 <sup>de</sup>	11,17 ± 3,01 <sup>fg</sup>
BD 2,0	87,79 ± 0,58 <sup>de</sup>	81,15 ± 1,33 <sup>c</sup>	0,293 ± 0,008 <sup>ef</sup>	0,097 ± 0,004 <sup>ab</sup>	0,56 ± 0,05 <sup>g</sup>	36,82 ± 4,27 <sup>cd</sup>	6,02 ± 0,43 <sup>g</sup>
CE	88,47 ± 1,14 <sup>de</sup>	22,58 ± 1,01 <sup>de</sup>	0,129 ± 0,004 <sup>h</sup>	0,076 ± 0,001 <sup>f</sup>	14,19 ± 1,1 <sup>a</sup>	3,20 ± 0,11 <sup>g</sup>	709,82 ± 50,9 <sup>a</sup>
EH 0,5	83,83 ± 0,57 <sup>f</sup>	18,66 ± 0,27 <sup>e</sup>	0,176 ± 0,007 <sup>g</sup>	0,081 ± 0,001 <sup>e</sup>	2,27 ± 0,16 <sup>f</sup>	78,27 ± 9,96 <sup>b</sup>	46,57 ± 5,0 <sup>efg</sup>
EH 1,0	81,58 ± 0,38 <sup>fg</sup>	22,01 ± 0,61 <sup>e</sup>	0,160 ± 0,0 <sup>gh</sup>	0,088 ± 0,002 <sup>d</sup>	3,72 ± 0,21 <sup>e</sup>	46,44 ± 8,41 <sup>c</sup>	133,41 ± 8,46 <sup>d</sup>
EH 2,0	80,12 ± 0,14 <sup>g</sup>	21,07 ± 0,41 <sup>e</sup>	0,147 ± 0,003 <sup>gh</sup>	0,090 ± 0,002 <sup>d</sup>	3,53 ± 0,28 <sup>e</sup>	39,87 ± 3,11 <sup>cd</sup>	139,58 ± 24,1 <sup>d</sup>
ED 0,5	87,51 ± 1,16 <sup>de</sup>	22,21 ± 0,12 <sup>e</sup>	0,314 ± 0,002 <sup>cde</sup>	0,089 ± 0,002 <sup>d</sup>	2,68 ± 0,14 <sup>df</sup>	83,76 ± 10,6 <sup>b</sup>	62,17 ± 7,0 <sup>e</sup>
ED 1,0	87,00 ± 0,26 <sup>de</sup>	18,31 ± 0,26 <sup>e</sup>	0,275 ± 0,009 <sup>f</sup>	0,090 ± 0,002 <sup>d</sup>	3,59 ± 0,30 <sup>c</sup>	36,89 ± 10,7 <sup>g</sup>	151,82 ± 15,5 <sup>b</sup>
ED 2,0	86,90 ± 0,38 <sup>e</sup>	19,01 ± 0,52 <sup>e</sup>	0,338 ± 0,014 <sup>cd</sup>	0,091 ± 0,002 <sup>cd</sup>	6,74 ± 0,66 <sup>e</sup>	3,65 ± 0,45 <sup>cd</sup>	316,71 ± 48,9 <sup>cd</sup>

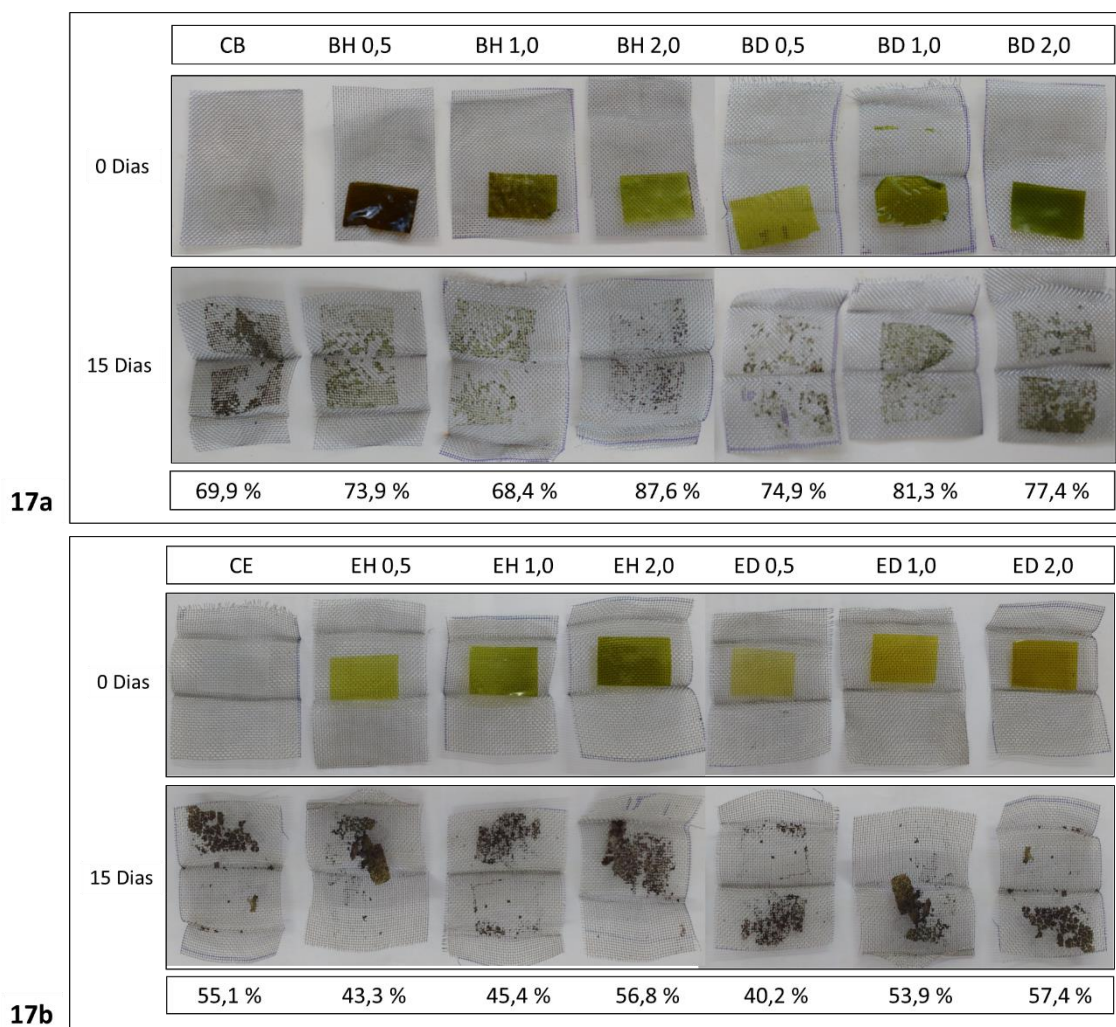
**Tabela 2** – Umidade, Solubilidade, Permeabilidade ao vapor de água (PVA), Espessura (E) e Propriedades Mecânicas (resistência à tração (RT), alongação na ruptura (ER) e o módulo de Young (MY)) dos filmes controle e contendo biomassa e extrato de microalga.

\*PEAD: Controle com Polietileno de Alta Densidade; CB: Controle dos filmes com biomassa; CE: Controle dos filmes com extrato; BH 0,5, BH 1,0 e BH 2,0: Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de Biomassa de *Heterochlorella luteoviridis*; BD 0,5, BD 1,0 e BD 2,0: Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de Biomassa de *Dunaliella tertiolecta*. EH 0,5, EH 1,0 e EH 2,0 Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de Extrato de *Heterochlorella luteoviridis*. ED 0,5, ED 1,0 e ED 2,0: Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de Extrato de *Dunaliella tertiolecta*. Valores médios ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa (p < 0,05).

A biodegradabilidade dos filmes está diretamente relacionada a solubilidade, pois quanto mais solúvel for o filme maior será a sua degradação em contato com a água e com os microrganismos contidos na microbiota do solo, que inclui bactérias, fungos e protozoários. A aparência dos filmes antes e após os 15 dias de análise de biodegradabilidade são apresentados na Figura 17. Observa-se que ocorreu uma grande deterioração macroscópica devido a adição periódica de água, que provavelmente tenha auxiliado para a perda de compostos solúveis, fazendo com que os filmes perdessem seu aspecto inicial e integridade estrutural, demonstrando claramente a sua degradabilidade.

O índice quantitativo de degradabilidade dos filmes foi a perda de massa, onde ao final dos 15 dias o filme CB obteve uma perda de massa de 69,9 % e o CE 55,1 %. Para os filmes contendo biomassa de microalga a máxima perda de massa foi de 87,6 % para o filme BH 2,0, já para os filmes contendo extrato a perda máxima foi para o filme ED 2,0 com 57,4 %. Produtos derivados de fibras naturais são altamente biodegradáveis, a perda da resistência interfacial entre fibras e matriz polimérica interferem no processo de degradação (AZWA et al., 2013).

No Brasil não existe uma norma para biodegradabilidade de matérias, porém, a norma europeia EN13432 (2000) exige que os plásticos biodegradáveis tenham 90 % de sua massa fragmentada em água, CO<sub>2</sub> e biomassa em um período de seis meses. Frente aos resultados obtidos, os filmes foram degradados rapidamente e podem ser considerados materiais biodegradáveis.



**Figura 17** – Aspecto visual e percentual de perda de massa dos filmes controle e contendo biomassa (a) e extrato (b) das microalgas, no dia 0 e após 15 dias enterrado em solo.

CB: Controle dos filmes com biomassa; CE: Controle dos filmes com extrato; BH 0,5, BH 1,0 e BH 2,0: Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de Biomassa de *Heterochlorella luteoviridis*; BD 0,5, BD 1,0 e BD 2,0: Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de Biomassa de *Dunaliella tertiolecta*. EH 0,5, EH 1,0 e EH 2,0 Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de Extrato de *Heterochlorella luteoviridis*. ED 0,5, ED 1,0 e ED 2,0: Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de Extrato de *Dunaliella tertiolecta*.

Nos resultados da análise de espessura dos filmes com biomassa, conforme houve um aumento da quantidade de biomassa ocorreu um aumento na espessura dos filmes. Isso pode estar relacionado ao aumento de sólidos presente na formulação, observando que existe diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre estes filmes. Já os filmes com extrato de microalgas apresentaram espessuras menores em relação aos filmes com biomassa; somente o filme EH 0,5 teve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dentro do grupo dos filmes com extrato. A espessura pode interferir nas propriedades mecânicas, a sua variação pode alterar o comportamento dos filmes quanto a resistência, elasticidade e rigidez.

As propriedades mecânicas podem ser influenciadas por interação entre proteínas e hidrocoloide, onde as proteínas e plastificantes desempenham um papel muito importante nessas propriedades (PARK et al., 2001). Todos os resultados referentes a espessura (E) e propriedades mecânicas (resistência à tração (RT), alongação na ruptura (ER) e o módulo de Young (MY)) estão apresentados na Tabela 2.

Avaliando os resultados das propriedades mecânicas, observa-se que, nos filmes com biomassa, ocorre um aumento na alongação na ruptura dos filmes BD com a adição da biomassa com diferença significativa entre os filmes BD 2,0 e CB, e entre o BD 0,5 e o BD 2,0. Nos filmes BH, nenhuma das formulações se diferenciou do controle CB, mas também ocorreu um aumento na alongação na ruptura com diferença significativa entre os filmes BH 0,5 e o BH 2,0. Com relação a resistência à tração, tanto os filmes BD quanto os BH, tiveram uma diminuição neste parâmetro e se diferenciaram do controle CB, sendo que os filmes contendo 1,0 % e 2,0 % das biomassas, não tiveram diferença significativa entre eles. Para a análise de módulo de Young, somente a formulação BD 0,5 não se diferenciou do controle, nas demais formulações ocorreu uma diminuição nesta propriedade em relação ao controle CB.

Isso representa que, os filmes com biomassa na formulação se tornam menos rígido e resistente, porém com uma maior flexibilidade. Esses resultados podem estar relacionados com o possível efeito plastificante das microalgas. Outro efeito causado pelas microalgas é o aumento da hidrofiliabilidade dos filmes, que também é uma característica da maioria dos plastificantes empregados em filme de amido (COUPLAND et al., 2000). Efeitos semelhantes foram identificados por Mali et al. (2006) em estudo sobre a ação do plastificante glicerol nas propriedades mecânicas em filme com amido de mandioca. A medida que a quantidade de glicerol aumentou (20 % e 30 %) os valores de resistência e módulo de Young diminuíram e a alongação aumentou.

Em contrapartida, para as análises mecânicas dos filmes contendo o extrato das microalgas, obtiveram comportamentos diferentes comparados com os filmes contendo biomassa. Em relação a resistência à tração, a adição do extrato aumentou a resistência dos filmes em comparação com o controle CE, mas o filme ED 2,0 não teve diferença significativa em relação ao CE. Nos filmes EH o aumento do extrato de 0,5 % para 1,0 % diminuiu a resistência, assim como o aumento da adição de extrato de *D. tertiolecta*

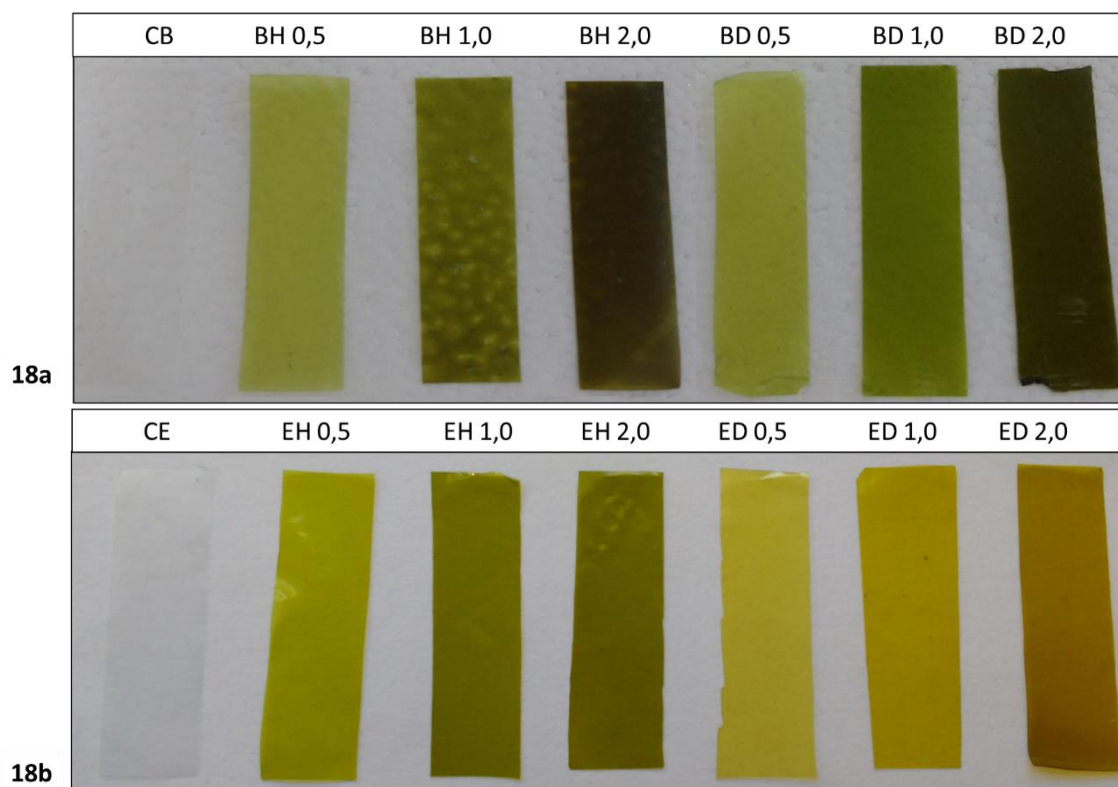


também diminui a resistência à tração dos filmes. Já para as análises de alongação na ruptura e módulo de Young as adições dos extratos diminuíram esses parâmetros em relação ao controle, porém ocorreu um aumento, tanto na alongação quanto no módulo de Young, com o aumento das concentrações dos extratos.

Este efeito por ser explicado como um efeito antiplastificante, que diminui a flexibilidade e a hidrofiliabilidade dos filmes. Isso indica que pode estar ocorrendo interações mais fortes do tipo ponte de hidrogênio entre o amido e o extrato de alga, que induzem a um decréscimo da mobilidade molecular e da capacidade de ligação com a água.

Alguns estudos, também com o objetivo de formar filmes com a adição de algas foram desenvolvidos e avaliados quanto as propriedades mecânicas. Porém, os materiais de base e a alga são diferentes, portanto, as interações e compatibilidade entre os materiais geram resultados diferentes. Em estudo feito com aplicação de alga vermelha (*Gelidium corneum*) em filme com base de proteína de farelo de arroz (5,0%), foram testadas dosagens de 1,0, 2,0 e 3,0 % de alga vermelha. O resultado para resistência à tração aumentou com o aumento da concentração de alga, já a alongação diminuiu (SHIN; JANG; SONG, 2011). Em outro estudo, também utilizando alga vermelha (*Gelidium corneum*), farinha de casca de caqui como base, a análise de resistência à tração passou de 6,05 MPa com 0 % de alga para 7,31 MPa com a adição de 1,0 % da alga, porém diminuiu para 3,32 MPa com o aumento da alga em 2,0 %. Já para a análise de alongação na ruptura ocorreu um aumento significativo na propriedade com o aumento da porcentagem da alga (JO et al., 2014).

Comparando somente os filmes controle CB e CE, observa-se um efeito antiplastificante nas propriedades mecânicas, isso pode estar relacionado com a interação do *Tween* 80 com o amido. Que reforça a rede do amido, fazendo com que os filmes se tornem mais rígidos e conseqüentemente menos flexíveis.



**Figura 18** – Aspecto visual dos filmes controle e contendo biomassa (a) e extrato (b) de microalga com concentrações de 0,5 %, 1 % e 2 %.

CB: Controle dos filmes com biomassa; CE: Controle dos filmes com extrato; BH 0,5, BH 1,0 e BH 2,0: Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de Biomassa de *Heterochlorella luteoviridis*; BD 0,5, BD 1,0 e BD 2,0: Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de Biomassa de *Dunaliella tertiolecta*. EH 0,5, EH 1,0 e EH 2,0 Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de Extrato de *Heterochlorella luteoviridis*. ED 0,5, ED 1,0 e ED 2,0: Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de Extrato de *Dunaliella tertiolecta*.

As propriedades ópticas são muito importantes para embalagens, pois influenciam sobre o aspecto e a aplicabilidade dos filmes. A adição de diferentes concentrações da biomassa e do extrato das microalgas causaram um escurecimento nos filmes e conseqüentemente um decréscimo na transparência dos mesmos (Figura 18). As propriedades referentes a cor e opacidade estão na Tabela 3. Os parâmetros de cor  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  para o Branco foram 97,57, 0,07 e 1,78 respectivamente. Os valores de cor  $L^*$  são os mais importantes para os filmes desenvolvidos neste trabalho, esse parâmetro avalia a luminosidade e o quanto os filmes são escuros, portanto, quanto maior a quantidade de microalga aplicada ao filme menor é o valor de  $L^*$  e conseqüentemente, maior a sua opacidade, pois ocasionam um maior bloqueio da passagem de UV e luz visível.

O aumento da quantidade de microalga, tanto na forma de biomassa como na de extrato, ocasionou uma diminuição na luminosidade (cor  $L^*$ ) dos filmes, e

consequentemente o aumento da opacidade. Os valores negativos para o parâmetro  $a^*$  apontam para a cor verde dos filmes ocasionadas pela presença da clorofila e os valores positivos na análise de cor  $b^*$  indica a incidência de cor amarela, possivelmente proveniente dos carotenoides presentes nas microalgas.

	Parâmetros de cor				Opacidade (A mm <sup>-1</sup> )
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$	
<b>CB</b>	92,35 ± 0,29 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,02 <sup>a</sup>	-2,39 ± 0,07 <sup>i</sup>	6,72 ± 0,25 <sup>k</sup>	1,13 ± 0,01 <sup>h</sup>
<b>CE</b>	90,80 ± 0,15 <sup>b</sup>	1,21 ± 0,04 <sup>a</sup>	-2,22 ± 0,04 <sup>i</sup>	7,82 ± 0,13 <sup>k</sup>	1,14 ± 0,01 <sup>h</sup>
<b>BH 0,5</b>	65,75 ± 1,20 <sup>f</sup>	-18,02 ± 0,61 <sup>f</sup>	51,86 ± 1,79 <sup>e</sup>	62,05 ± 1,77 <sup>g</sup>	3,34 ± 0,06 <sup>d</sup>
<b>BH 1,0</b>	51,86 ± 0,86 <sup>j</sup>	-16,00 ± 0,70 <sup>e</sup>	46,09 ± 1,87 <sup>f</sup>	65,68 ± 0,82 <sup>f</sup>	6,61 ± 0,09 <sup>b</sup>
<b>BH 2,0</b>	34,05 ± 0,66 <sup>k</sup>	-6,90 ± 1,67 <sup>b</sup>	17,62 ± 0,93 <sup>g</sup>	65,86 ± 0,66 <sup>ef</sup>	9,47 ± 0,23 <sup>a</sup>
<b>BD 0,5</b>	77,45 ± 0,69 <sup>d</sup>	-18,32 ± 0,85 <sup>f</sup>	55,81 ± 3,19 <sup>d</sup>	61,27 ± 3,28 <sup>h</sup>	2,39 ± 0,06 <sup>f</sup>
<b>BD 1,0</b>	70,38 ± 0,35 <sup>e</sup>	-21,40 ± 0,34 <sup>g</sup>	67,27 ± 0,37 <sup>b</sup>	74,08 ± 0,3 <sup>b</sup>	5,44 ± 0,16 <sup>c</sup>
<b>BD 2,0</b>	54,82 ± 0,81 <sup>i</sup>	-20,82 ± 0,38 <sup>g</sup>	50,80 ± 1,73 <sup>e</sup>	68,76 ± 1,25 <sup>cde</sup>	6,41 ± 0,11 <sup>b</sup>
<b>EH 0,5</b>	77,54 ± 0,25 <sup>d</sup>	-17,62 ± 0,10 <sup>f</sup>	55,57 ± 0,98 <sup>d</sup>	60,15 ± 0,93 <sup>h</sup>	1,80 ± 0,05 <sup>g</sup>
<b>EH 1,0</b>	60,61 ± 0,53 <sup>g</sup>	-15,74 ± 0,48 <sup>e</sup>	60,35 ± 0,18 <sup>c</sup>	71,10 ± 0,39 <sup>c</sup>	3,02 ± 0,01 <sup>de</sup>
<b>EH 2,0</b>	57,58 ± 0,34 <sup>h</sup>	-15,53 ± 0,23 <sup>e</sup>	56,32 ± 0,39 <sup>d</sup>	69,46 ± 0,15 <sup>cd</sup>	3,00 ± 0,06 <sup>d</sup>
<b>ED 0,5</b>	82,80 ± 0,16 <sup>c</sup>	-10,10 ± 0,16 <sup>c</sup>	42,59 ± 1,04 <sup>g</sup>	44,18 ± 1,02 <sup>j</sup>	1,22 ± 0,01 <sup>h</sup>
<b>ED 1,0</b>	77,53 ± 0,25 <sup>d</sup>	-11,91 ± 0,13 <sup>d</sup>	64,73 ± 0,53 <sup>b</sup>	67,28 ± 0,56 <sup>def</sup>	1,24 ± 0,01 <sup>h</sup>
<b>ED 2,0</b>	69,42 ± 0,26 <sup>e</sup>	-10,00 ± 0,05 <sup>c</sup>	73,26 ± 1,01 <sup>a</sup>	77,10 ± 1,01 <sup>a</sup>	2,16 ± 0,02 <sup>f</sup>

**Tabela 3** – Cor e Opacidade dos filmes controle e contendo biomassa e extrato de microalga.

CB: Controle dos filmes com biomassa; CE: Controle dos filmes com extrato; BH 0,5, BH 1,0 e BH 2,0: Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de Biomassa de *Heterochlorella luteoviridis*; BD 0,5, BD 1,0 e BD 2,0: Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de Biomassa de *Dunaliella tertiolecta*. EH 0,5, EH 1,0 e EH 2,0 Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de Extrato de *Heterochlorella luteoviridis*. ED 0,5, ED 1,0 e ED 2,0: Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de Extrato de *Dunaliella tertiolecta*. Valores médios ± desvio padrão (n=3).

Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa (p < 0,05).

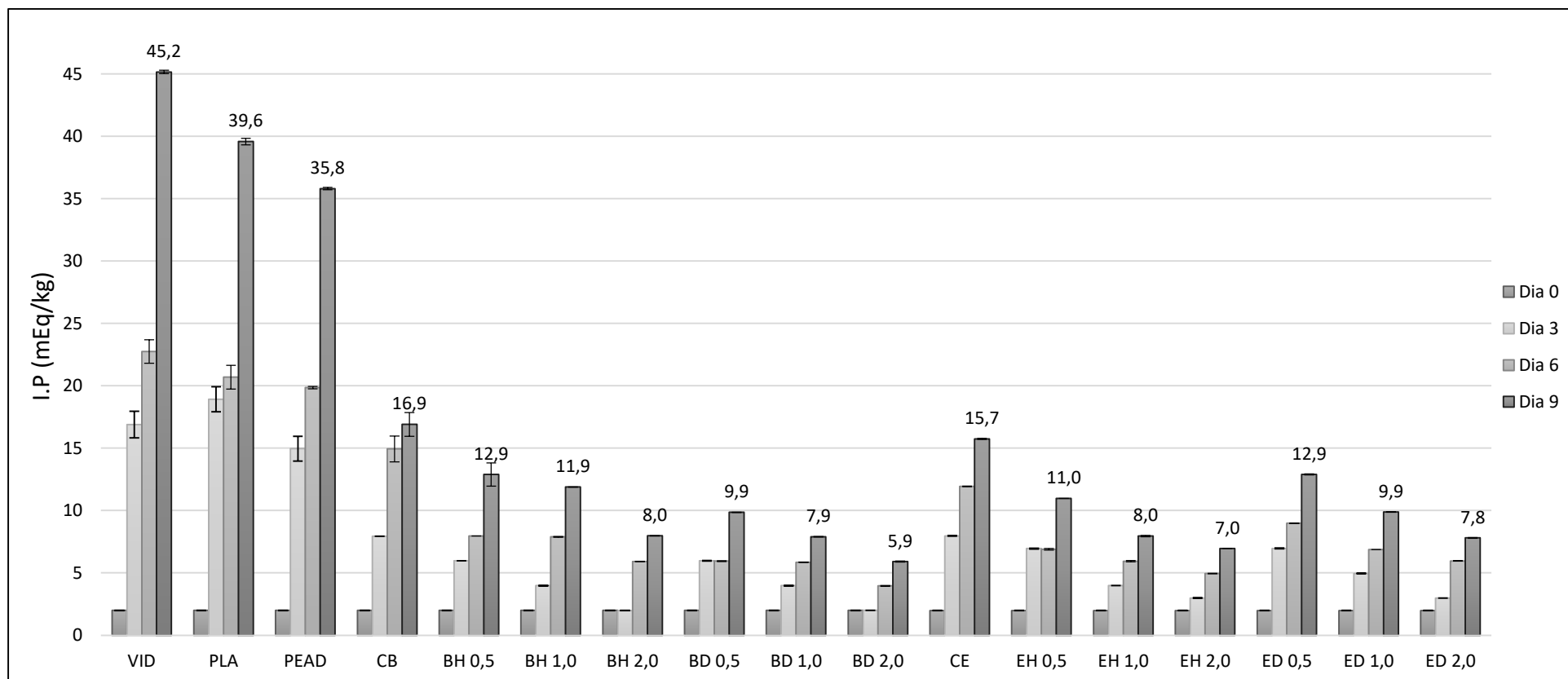
A fim de avaliar a ação protetora dos filmes contra a oxidação lipídica, foi realizado um ensaio de oxidação acelerada de óleo de girassol embalados nos diferentes filmes produzidos. Como controle, utilizou-se garrafas de plástico fechadas (PLA) chamado de controle fechado, placas de Petri de vidro aberto (VID), chamado de controle aberto, embalagem de PEAD, chamado de controle plástico e filme de amido

sem a adição de microalga CB (controle para filmes com biomassa) e CE (controle para filmes com extrato). Os valores de índice de peróxidos do óleo de girassol foram medidos nos dias 0, 3, 6 e 9 (Figura 19). O valor inicial (dia 0) do óleo de girassol foi de 1,99 mEq/kg. O óleo embalado em PLA, VID e PEAD ultrapassaram o limite de 10 mEq/kg, limite de peróxidos estipulado pela *Codex Alimentarius*, já no terceiro dia, atingindo os valores de 45,15 mEq/kg, 39,58 mEq/kg e 35,81 mEq/kg respectivamente; os controles CB e CE ultrapassaram esse limite no sexto dia, e os filmes BH 0,5, BH 1,0 EH 0,5 e ED 0,5 atingiram esse limite apenas no nono dia, os demais filmes não atingiram o limite máximo de índice peróxidos durante o período da análise. Esses resultados confirmam que o óleo de girassol permaneceu estável até o nono dia, sob um ensaio de oxidação acelerada.

Os filmes contendo maior quantidade de microalga apresentaram os menores valores de peróxidos provavelmente devido a presença de compostos antioxidantes proveniente dos carotenoides e das clorofilas encontrados nas microalgas. Os carotenoides podem controlar a oxidação lipídica através da inibição de radicais livres induzidos pela peroxidação lipídica (RIOS; MERCADANTE; BORSARELLI, 2007). Os carotenoides também proporcionaram uma cor mais escura e uma maior opacidade aos filmes possivelmente auxiliando na diminuição da foto-oxidação do óleo embalado com esses filmes.

Estudos demonstraram que os filmes à base de polietileno de baixa densidade (PEBD) com a adição de extrato de calêndula, uma fonte de astaxantina, tiveram um efeito benéfico na estabilidade do óleo de soja embalado. Esta ação protetora foi atribuída à presença de carotenoides do extrato de calêndula, que têm a capacidade de atuar como agentes antioxidantes (COLÍN-CHÁVEZ et al., 2013). Além desse, outro estudo produziu filmes usando amido de mandioca como matriz polimérica e pasta de manga e extrato de erva mate, estes filmes foi embalado óleo de palma e mantido em condições aceleradas (63% de HR a 30 ° C) durante 90 dias. O óleo embalado apresentou uma diminuição na taxa de oxidação (REIS et al., 2015). Também utilizando amido de mandioca, Pagno *et al.* (2016) adicionou 2 %, 5 %, 8 % e 10 % de bixina nanoencapsulada na solução filmogênica e avaliou sua atividade antioxidante no óleo de girassol, que

indicou que as películas com altas concentrações do aditivos melhoraram a estabilidade do óleo.



**Figura 19** – Resultado do Índice de Peróxidos dos filmes controle e contendo biomassa e extrato de microalga.

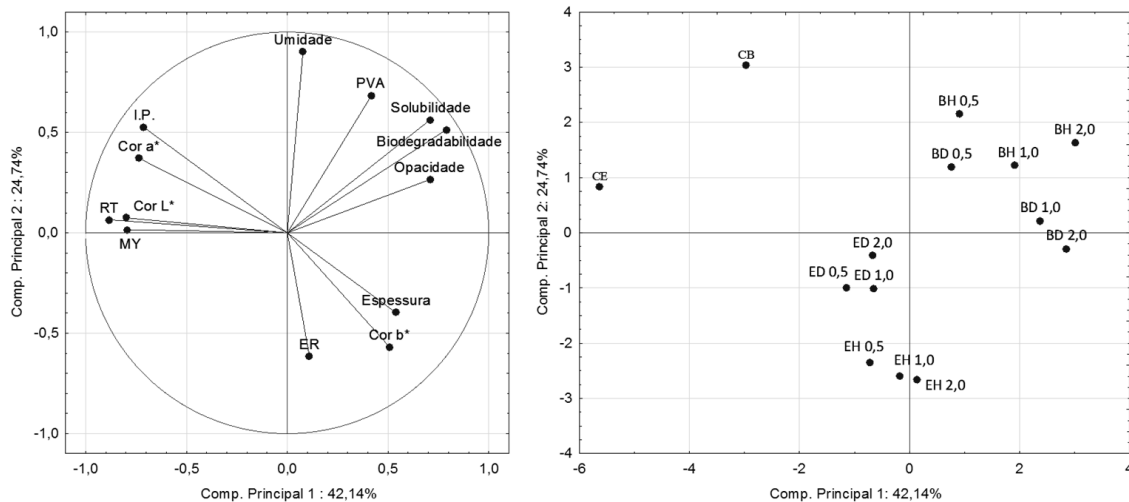
VID: Placa de vidro aberta; PLA: garrafa de plástico fechada; PEAD: embalagem de polietileno de alta densidade; CB: Controle dos filmes com biomassa; CE: Controle dos filmes com extrato; BH 0,5, BH 1,0 e BH 2,0: Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de Biomassa de *Heterochlorella luteoviridis*; BD 0,5, BD 1,0 e BD 2,0: Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de Biomassa de *Dunaliella tertiolecta*. EH 0,5, EH 1,0 e EH 2,0 Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de Extrato de *Heterochlorella luteoviridis*. ED 0,5, ED 1,0 e ED 2,0: Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de Extrato de *Dunaliella tertiolecta*.

Para análise dos resultados de caracterização do filme usou-se a metodologia de Análise de Componentes Principais (ACP).

A técnica estatística de ACP é utilizada em estudos que contenham um grande número de variáveis correlacionadas com o objetivo de diminuir o conjunto de dados. A análise é utilizada para converter um conjunto de observações de variáveis correlacionadas num conjunto de valores de variáveis linearmente não correlacionadas chamadas de componentes principais. Estes componentes são escolhidos para conservar a maior parte da variância presente nas variáveis originais.

As quatorze diferentes formulações dos filmes biodegradáveis foram avaliadas em treze parâmetros referentes a sua caracterização físico-químicas, de barreira, ópticas, mecânicas e antioxidante (Figura 20). Pode se observar que o componente principal 1 (PC1) estava relacionado com os parâmetros solubilidade, cor  $L^*$ , cor  $a^*$ , opacidade, resistência a tração (RT), módulo de Young (MY), índice de peróxidos (IP) e biodegradabilidade. O componente principal 2 (PC2) relacionado com a umidade. Os parâmetros de espessura, PVA, cor  $b^*$  e alongação na ruptura não contribuíram significativamente para a análise de diferenciação das formulações dos filmes. A variância total dos dados foi de 80,86 % com as contribuições significativas de 42,14 % para o PC1, 24,74 % para o PC2 e 13,98 % para PC3.

Pode-se observar que formulações contendo biomassa das microalgas obtiveram os maiores valores para opacidade, solubilidade, biodegradabilidade. Já os filmes contendo extrato das microalgas, apresentaram os menores valores para estes parâmetros. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que a biomassa apresenta um caráter plastificante, onde os grupamentos hidroxilas tornam o filme mais higroscópico e assim aumentam a sua solubilidade e conseqüentemente alta biodegradabilidade. O processo de extração com solvente etanólico faz com que os extratos de microalgas tenham uma maior quantidade de lipídios, pois ocorre uma concentração dos compostos orgânicos presentes nas microalgas. Isso torna os filmes mais hidrofóbicos fazendo com que os filmes EH e ED apresentem uma redução na solubilidade.



**Figura 20** – Análise de componentes principais das quatorze formulações de filmes biodegradáveis.

IP: índice de peróxidos; RT: resistência a tração; MY: módulo de Young; ER: elongação na ruptura.

CB: Controle dos filmes com biomassa; CE: Controle dos filmes com extrato; BH 0,5, BH 1,0 e BH 2,0: Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de biomassa de *Heterochlorella luteoviridis*; BD 0,5, BD 1,0 e BD 2,0: Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de biomassa de *Dunaliella tertiolecta*. EH 0,5, EH 1,0 e EH 2,0 Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de extrato de *Heterochlorella luteoviridis*. ED 0,5, ED 1,0 e ED 2,0: Filme com 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de extrato de *Dunaliella tertiolecta*.

## 5.2 Seleção e aplicação da melhor formulação

Os filmes foram analisados em relação aos resultados de espessura, resistência à tração, percentagem de elongação na ruptura, módulo de Young, teor de umidade, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor de água, cor, opacidade, biodegradabilidade e atividade antioxidante. Perante os resultados de todas as análises, a formulação EH 2,0 foi a que obteve os melhores valores no conjunto das propriedades mecânicas, mas principalmente, baixos valores de solubilidade, umidade e PVA, portanto foi a formulação selecionada.

## 5.3 Percentual de lipídios e atividade oxidante do salmão

O percentual de extração de lipídeos através do método utilizado, foi em média 10,7 %. Porém, as análises de índice de peróxidos, dienos e trienos não corroboraram para a avaliação do óleo extraído das amostras de salmão. Possivelmente devido a sensibilidade do método de identificação de oxidação dos lipídios, que foi afetada pela quantidade de lipídios de cada amostra e também pelas possíveis variações no método de extração.

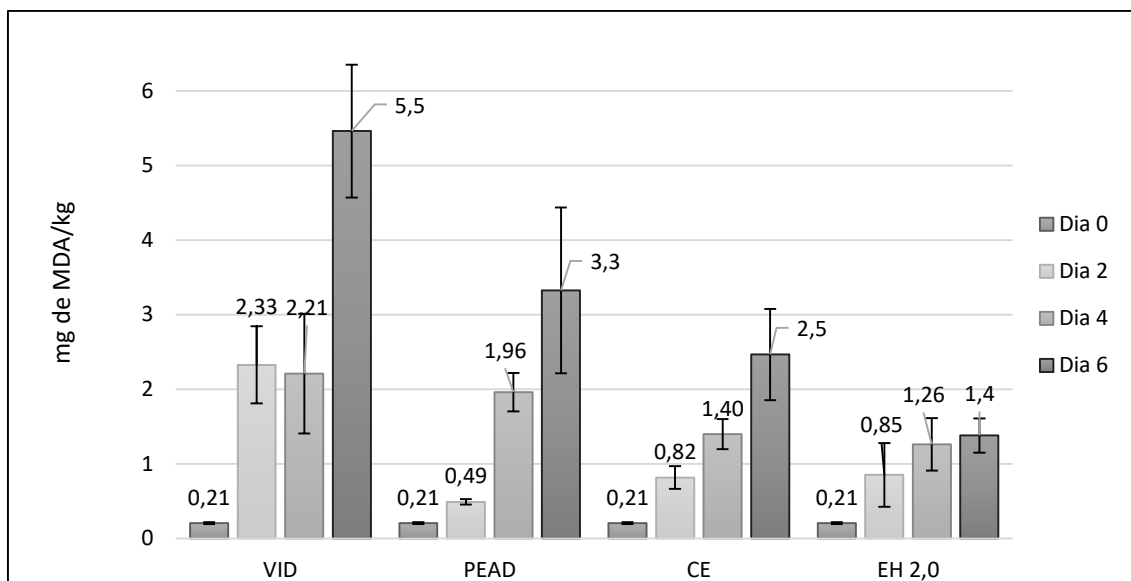


Já para o método que apresenta o índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) os resultados foram mais representativos e estão apresentados na Figura 21. A oxidação lipídica foi retardada pelo filme EH 2,0 no decorrer dos dias, provavelmente devido a presença dos carotenoides da microalga, que além de possuir compostos antioxidantes, também proporciona uma coloração escura e uma maior opacidade ao filme comparado as demais embalagens testadas, isso, possivelmente auxiliou na diminuição da foto-oxidação do salmão.

Outro parâmetro importante para a conservação dos peixes é a permeabilidade ao vapor de água das embalagens. Os polímeros sintéticos proporcionam uma menor interação do alimento com o meio externo. Desta forma o salmão embalado com PEAD não teve uma perda de umidade significativa com o passar do tempo e acumulou líquido no interior da embalagem. Já as amostras VID, CE e EH 2,0 tiveram uma perda de umidade maior (Figura 22), tornando a carne mais seca.

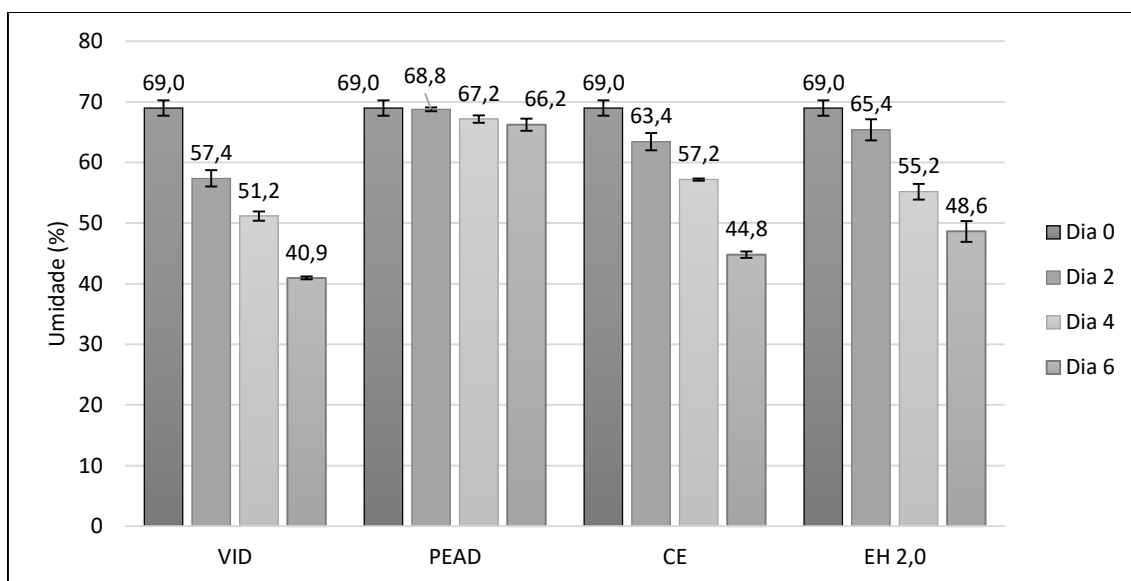
Não foi encontrado um indicativo de valor máximo de TBARS em pescado permitido na legislação brasileira. Porém, um alto índice compromete a comercialização e a aceitação do produto final, pois, segundo dados encontrados na literatura valores acima de 1 a 2 mg/kg de malonaldeído em pescado está associado ao odor e sabor característicos de ranço (TOMITA et al., 2006).

Portanto, nas condições testadas, somente a amostra embalada com EH 2,0 estaria apta para o consumo até o sexto dia de armazenamento. Porém, a comercialização de peixes frescos deve ser feita a temperaturas abaixo de 2 °C por aproximadamente 2 a 3 dias.



**Figura 21** – Variação do Índice de TBARS do salmão durante os dias de armazenamento.

VID: Placa de vidro aberta; PEAD: embalagem de polietileno de alta densidade; CE: Controle dos filmes com extrato; EH 2,0 Filme com 2,0 % de Extrato de *Heterochlorella luteoviridis*.



**Figura 22** – Variação da umidade do salmão durante os dias de armazenamento.

VID: Placa de vidro aberta; PEAD: embalagem de polietileno de alta densidade; CE: Controle dos filmes com extrato; EH 2,0 Filme com 2,0 % de Extrato de *Heterochlorella luteoviridis*.

## 6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, o presente trabalho demonstrou ser possível produzir filmes biodegradáveis com propriedades antioxidantes a partir de amido de mandioca com a adição de biomassa seca e extrato de biomassa de microalga *Heterochlorella luteoviridis* e *Dunaliella tertiolecta*. De modo geral, a adição das microalgas, tanto biomassa como de extrato, apresentaram alterações nas propriedades de cor, proporcionando uma cor verde aos filmes, devido às clorofilas presentes nas microalgas. Estes compostos auxiliaram também na proteção do óleo de girassol contra o processo de oxidação em condições aceleradas de experimento em todas as formulações dos filmes.

A aplicação da biomassa de ambas as microalgas ocasionou um aumento nas propriedades de solubilidade, biodegradabilidade e opacidade dos filmes, devido a hidrólise das ligações glicosídicas do amido provocadas pelas microalgas. Isso também implicou nas propriedades mecânicas dos filmes, provocando um efeito plastificante, com o aumento da elongação na ruptura e uma diminuição na resistência a tração e módulo de Young.

Porém, a aplicação do extrato resultou em filmes com características inversas aos filmes com biomassa. Nas propriedades mecânicas ocorreu um aumento na resistência a tração e módulo de Young e diminuição na elongação na ruptura. E o filme EH 2,0 foi o que obteve o menor valor para permeabilidade ao vapor de água.

A aplicação dos filmes em salmão foi eficiente quanto a retardação da oxidação lipídica, porém não foi eficiente para evitar a perda de umidade do peixe.

Contudo, o presente trabalho evidencia o potencial da produção de filmes biodegradáveis a partir de amido de mandioca com adição de microalgas *Heterochlorella luteoviridis* e *Dunaliella tertiolecta*, com características de biodegradabilidade e sustentabilidade. Os filmes biodegradáveis desenvolvidos são uma boa alternativa para embalagens antioxidantes, contribuindo para o aumento da vida de prateleira dos alimentos.



## **7 PERSPECTIVAS**

Novos estudos podem ser feitos a partir da aplicação do filme em salmão com o objetivo de avaliar a microbiologia do peixe.

Aplicar os filmes elaborados neste trabalho em outros alimentos com umidades e composição diferentes, afim de avaliar sua adaptação e resistência.

E adicionar um agente hidrofóbico ou fibras nos filmes elaborados com a adição da biomassa com o objetivo de diminuir a sua solubilidade e garantir sua aplicação em algum alimento.



## 8 REFERÊNCIAS

ABALDE, J.; FABREGAS, J.; HERRERO, C.  $\beta$ -Carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources. **Bioresource technology**, v. 38, n. 2–3, p. 121–125, 1991.

ABIPLAST. Associação Brasileira da Indústria do Plástico,. **Perfil 2015 - Indústria Brasileira de Transformação de Material Plástico.**, p. <http://www.abiplast.org.br/site/estatisticas>, 2015.

ABRELPE. Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais. **Panorama dos resíduos sólidos no Brasil**, 2015.

AHMAD, A. L. et al. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 1, p. 584–593, 2011.

AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 46, p. 10835–10847, 2013.

AND, Z. L.; HAN, J. H. Film-forming Characteristics of Starches. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 1, p. E31–E36, 2005.

ANDERSEN, R. A. **Algal culturing techniques**. [s.l.] Academic press, 2005.

ANVISA. ANVISA -Agência Nacional de Vigilância Sanitária. p. <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos>, 2008.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**. [s.l.] AOAC International, 2005.

AOCS. Peroxide value acetic acid-chloroform method- AOCS Official Method Cd 8-53. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. **4th ed. Champaign**, p. Oil Chemists' Society, 1993.

ARNON, H. et al. Effects of carboxymethyl cellulose and chitosan bilayer edible coating on postharvest quality of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 87, n. 0, p. 21–26, 2014.

ARVANITOYANNIS, I.; BILIADERIS, C. G. Physical properties of polyol-plasticized edible blends made of methyl cellulose and soluble starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, n. 1, p. 47–58, 1999.

ASTM. Standard test method for water vapor transmission of materials (ASTM E 96-05). **Annual book of ASTM standards.**, p. American Society for Testing Materials, Philadelph, 2005.

ASTM. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting (ASTM

D882-12). **Annual book of ASTM standards.**, p. American Society for Testing Materials, Philadelphia, 2012.

AZWA, Z. N. et al. A review on the degradability of polymeric composites based on natural fibres. **Materials & Design**, v. 47, p. 424–442, 1 maio 2013.

BEN-AMOTZ, A.; FISHIER, R. Analysis of carotenoids with emphasis on 9-cis  $\beta$ -carotene in vegetables and fruits commonly consumed in Israel. **Food Chemistry**, v. 62, n. 4, p. 515–520, 1998.

BERGO, P.; MORAES, I. C. F.; SOBRAL, P. J. Effects of moisture content on structural and dielectric properties of cassava starch films. **Starch-Stärke**, v. 64, n. 10, p. 835–839, 2012.

BERTON-CARABIN, C. et al. Design of interfacial films to control lipid oxidation in oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 1, p. 99–105, 2013.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1 ago. 1959.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. [s.l.] Liv. Varela, 1992.

BOLUMAR, T.; ANDERSEN, M. L.; ORLIEN, V. Antioxidant active packaging for chicken meat processed by high pressure treatment. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1406–1412, 2011.

BONILLA, J. et al. Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 2, p. 208–213, 2012.

BOURTOOM, T. Edible films and coatings: characteristics and properties. **International Food Research Journal**, v. 15, n. 3, p. 237–248, 2008.

BROINIZI, P. R. B. et al. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 27, p. 902–908, 2007.

CAETANO, K. DOS S. et al. Application of active cassava starch films incorporated with oregano essential oil and pumpkin residue extract on ground beef. **Journal of Food Safety**, 2017.

CHIUMARELLI, M.; HUBINGER, M. D. Stability, solubility, mechanical and barrier properties of cassava starch – Carnauba wax edible coatings to preserve fresh-cut apples. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 1, p. 59–67, 2012.

COLÍN-CHÁVEZ, C. et al. Fabrication and Properties of Antioxidant Polyethylene-



based Films Containing Marigold (*Tagetes erecta*) Extract and Application on Soybean Oil Stability. 2013.

COLLA, E.; DO AMARAL SOBRAL, P. J.; MENEGALLI, F. C. Amaranthus cruentus flour edible films: influence of stearic acid addition, plasticizer concentration, and emulsion stirring speed on water vapor permeability and mechanical properties. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 18, p. 6645–6653, 2006.

CORTEZ-VEGA, W. R. et al. Using edible coatings from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) protein isolate and organo-clay nanocomposite for improve the conservation properties of fresh-cut “Formosa” papaya. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 22, n. 0, p. 197–202, 2014.

COUPLAND, J. N. et al. Modeling the effect of glycerol on the moisture sorption behavior of whey protein edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 43, n. 1, p. 25–30, 2000.

COUTINHO, N. M. CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E ESTABILIDADE LIPÍDICA EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE ESTOCAGEM DE PEIXES DULCÍCOLAS. 2015.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema (4a. ed.)**. Brasil: Grupo A - Artmed, 2010.

DAVIS, G.; SONG, J. H. Biodegradable packaging based on raw materials from crops and their impact on waste management. **Industrial Crops and Products**, v. 23, n. 2, p. 147–161, 2006.

DE ALMEIDA MELO, E. et al. Capacidade antioxidante de frutas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 2, 2008.

DE MORAES, J. O. et al. Scale-up of the production of cassava starch based films using tape-casting. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 4, p. 800–808, 2013.

DIPRAT, A. B. et al. Chemical composition of microalgae *Heterochlorella luteoviridis* and *Dunaliella tertiolecta* with emphasis on carotenoids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2016.

DOLE, P. et al. Gas transport properties of starch based films. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, n. 3, p. 335–343, 2004.

EISSA, H. A. A. Effect of chitosan coating on shelf life and quality of fresh-cut mushroom. **Journal of Food Quality**, v. 30, n. 5, p. 623–645, 2007.

EN 13432. Requirements for packaging recoverable through composting and biodegradation—test scheme and evaluation criteria for the final acceptance of packaging. 2000.

FALGUERA, V. et al. Edible films and coatings: Structures, active functions and

trends in their use. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 6, p. 292–303, 2011.

FARHOOSH, R. Shelf-life prediction of edible fats and oils using Rancimat. **Lipid Technology**, v. 19, n. 10, p. 232–234, out. 2007.

FAZELI, M. R. et al. Effects of salinity on beta-carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 18, p. 2453–2456, 2006.

FEIL, H. Biodegradable plastics from vegetable raw materials. **Agro-food-Industry Hi-Tech, July/August**, 1995.

FISHER, M. et al. A salt-resistant plasma membrane carbonic anhydrase is induced by salt in *Dunaliella salina*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 30, p. 17718–17723, 1996.

FRÉ, N. C. DA et al. Kinetic Modeling of *Dunaliella tertiolecta* Growth under Different Nitrogen Concentrations. **Chemical Engineering & Technology**, v. 39, n. 9, p. 1716–1722, 2016.

GALLI, C.; CALDER, P. C. Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: A critical review. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 55, n. 1–3, 2009.

GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. **Journal of food science**, v. 65, n. 6, p. 941–944, 2000.

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

GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 35, n. 1, p. 42–51, 2014.

GÓMEZ, E. F.; MICHEL JR, F. C. Biodegradability of conventional and bio-based plastics and natural fiber composites during composting, anaerobic digestion and long-term soil incubation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 98, n. 12, p. 2583–2591, 2013.

GOUVEIA, L. et al. Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 57, n. 2, p. 157–163, 1996.

GOUVEIA, L. et al. Microalgae–Source of natural bioactive molecules as functional ingredients. **Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 7, n. 2, p. 21–37, 2010.

GOYAL, A. Osmoregulation in *Dunaliella*, Part I: Effects of osmotic stress on

photosynthesis, dark respiration and glycerol metabolism in *Dunaliella tertiolecta* and its salt-sensitive mutant (HL 25/8). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 9, p. 696–704, 2007.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597, maio 1975.

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 (Campinas)**, v. 28, 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. R30–R39, 2008.

INBARAJ, B. S.; CHIEN, J. T.; CHEN, B. H. Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal of Chromatography A**, v. 1102, n. 1, p. 193–199, 2006.

JAESCHKE, D. P. et al. Carotenoid and lipid extraction from *Heterochlorella luteoviridis* using moderate electric field and ethanol. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1636–1643, 2016.

JANG, S. A. et al. Effects of Various Plasticizers and Nanoclays on the Mechanical Properties of Red Algae Film. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 3, p. N30–N34, 2011.

JIANG, Y. et al. 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, 28 abr. 2010.

JO, W.-S. et al. Physical properties and antimicrobial activities of a persimmon peel/red algae composite film containing grapefruit seed extract. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 1169–1172, 2014.

KOCHEM, L. H. et al. Characterization of a Novel Flat-Panel Airlift Photobioreactor With an Internal Heat Exchanger. **Chemical Engineering & Technology**, v. 37, n. 1, p. 59–64, 2014.

KU, K. J.; HONG, Y. H.; SONG, K. B. Mechanical Properties of a *Gelidium corneum* Edible Film Containing Catechin and Its Application in Sausages. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 3, p. C217–C221, 2008.

LAGO-VANZELA, E. S. et al. Edible coatings from native and modified starches retain carotenoids in pumpkin during drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 420–425, 2013.

LI, J.-H. et al. Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. **Food Hydrocolloids**, v. 37, n. 0, p. 166–173,

2014.

LIM, G.-O.; JANG, S.-A.; SONG, K. BIN. Physical and antimicrobial properties of Gelidium corneum/nano-clay composite film containing grapefruit seed extract or thymol. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 4, p. 415–420, 2010.

LIN, S.-Y.; CHEN, K.-S.; RUN-CHU, L. Organic esters of plasticizers affecting the water absorption, adhesive property, glass transition temperature and plasticizer permanence of Eudragit acrylic films. **Journal of Controlled Release**, v. 68, n. 3, p. 343–350, 2000.

LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C. et al. Immobilization of  $\beta$ -cyclodextrin in ethylene-vinyl alcohol copolymer for active food packaging applications. **Journal of Membrane Science**, v. 353, n. 1, p. 184–191, 2010.

LOURENCO, SERGIO DE OLIVEIRA. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. [s.l.] RiMa, 2006.

MALI, S. et al. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. **Journal of Food Engineering**, v. 75, n. 4, p. 453–460, ago. 2006.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 31, n. 1, p. 137–156, 2010.

MARAN, J. P. et al. Degradation behavior of biocomposites based on cassava starch buried under indoor soil conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 20–28, 2014.

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.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

MCHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Sorbitol-vs glycerol-plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 841–845, 1994.

MENEGOL, T. et al. NITROGÊNIO SOBRE A COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE Heterochlorella luteoviridis. **XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ X CIGR Section IV Technical Symposium.**, p. 1–6, 2016.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1 mar. 1959.

MOORE, C. J. Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat. **Environmental research**, v. 108, n. 2, p. 131–139, 2008.

MÜLLER, C. M. O.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 1, p. 82–87, 2008.

NEUSTUPA, J. et al. *Leptochlorella corticola* gen. et sp. nov. and *Kalinella apyrenoidosa* sp. nov.: two novel Chlorella-like green microalgae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) from subaerial habitats. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. 1, p. 377–387, 2013.

NORAJIT, K.; KIM, K. M.; RYU, G. H. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 3, p. 377–384, 2010.

NURACHMAN, Z. et al. Tropical marine *Chlorella* sp. PP1 as a source of photosynthetic pigments for dye-sensitized solar cells. **Algal Research**, v. 10, n. 0, p. 25–32, 2015.

OJEDA, G. A.; SGROPPO, S. C.; ZARITZKY, N. E. Application of edible coatings in minimally processed sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.) to prevent enzymatic browning. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 3, p. 876–883, 2014.

OROSA, M. et al. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3, p. 553–556, 2000.

ORTEGA-TORO, R. et al. Effect of the incorporation of surfactants on the physical properties of corn starch films. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 66–75, 2014.

OUKARROUM, A. et al. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 78, n. 0, p. 80–85, 2012.

PAGNO, C. H. Efeito da adição de nanoestruturas, óleos essenciais e quitosana no desenvolvimento de filmes e coberturas biodegradáveis com propriedades antioxidantes e antimicrobianas. 2016.

PAGNO, C. H. et al. Synthesis of biodegradable films with antioxidant properties based on cassava starch containing bixin nanocapsules. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 8, p. 3197–3205, 2016.

PARK, S. K. et al. Mechanical Properties and Water-Vapor Permeability of Soy-Protein Films Affected by Calcium Salts and Glucono- $\delta$ -lactone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2308–2312, 1 maio 2001.

PETERSSON, M.; STADING, M. Water vapour permeability and mechanical properties of mixed starch-monoglyceride films and effect of film forming conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 1, p. 123–132, 1 jan. 2005.

PETRIKOSKI, A. P. **Elaboração de biofilmes de fécula de mandioca e avaliação do seu uso na imobilização de caulinita intercalada com ureia**. Disponível em: <<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/649>>.

PHUKAN, M. M. et al. Microalgae Chlorella as a potential bio-energy feedstock. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3307–3312, 2011.

PIZARRO, C. et al. Determination of the peroxide value in extra virgin olive oils through the application of the stepwise orthogonalisation of predictors to mid-infrared spectra. **Food Control**, v. 34, n. 1, p. 158–167, 2013.

RATTAYA, S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Properties of fish skin gelatin film incorporated with seaweed extract. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 1, p. 151–157, 2009.

RAVEN, J. A.; EVANS, M. C. W.; KORB, R. E. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O<sub>2</sub>-evolving organisms. **Photosynthesis Research**, v. 60, n. 2, p. 111–150, 1999.

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

RIOS, A. DE O.; MERCADANTE, A. Z.; BORSARELLI, C. D. Triplet state energy of the carotenoid bixin determined by photoacoustic calorimetry. **Dyes and Pigments**, v. 74, n. 3, p. 561–565, 2007.

ROBERTSON, G. L. **Food packaging: principles and practice**. [s.l.] CRC press, 2016.

ROCHA PLÁCIDO MOORE, G. et al. Influence of the glycerol concentration on some physical properties of feather keratin films. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 7, p. 975–982, 2006.

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

SAKANAKA, L. S. **Confecção de filmes biodegradáveis por extrusão de blendas de amido termoplástico e polibutileno succinato co-adipato (PBSA)**. 2007 Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, , 2007.

SANTOS, A. M. P.; YOSHIDA, C. M. P. Técnico em alimentos: Embalagens. **Recife: UFRPE**, 2011.

SHAH, A. A. et al. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 3, p. 246–265, 2008.

SHIMAZU, A. A.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 79–88, 2007.

SHIN, Y.; JANG, S.-A.; SONG, K. Preparation and mechanical properties of rice bran protein composite films containing gelatin or red algae. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 703–707, 2011.

SILVA-WEISS, A. et al. Natural Additives in Bioactive Edible Films and Coatings: Functionality and Applications in Foods. **Food Engineering Reviews**, v. 5, n. 4, p. 200–216, 2013.

SOARES, N. M.; MENDES, T. S.; VICENTE, A. A. Effect of chitosan-based solutions applied as edible coatings and water glazing on frozen salmon preservation – A pilot-scale study. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 2, p. 316–323, 2013.

SOUZA, A. C. et al. Cassava starch biodegradable films: Influence of glycerol and clay nanoparticles content on tensile and barrier properties and glass transition temperature. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 110–117, 2012.

SOUZA, C. O. DE; SILVA, L. T.; DRUZIAN, J. I. Estudo comparativo da caracterização de filmes biodegradáveis de amido de mandioca contendo polpas de manga e de acerola. **Química Nova**, v. 35, p. 262–267, 2012.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.

TAKAGI, M.; KARSENKO; YOSHIDA, T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 3, p. 223–226, 2006.

TALJA, R. A. et al. Effect of type and content of binary polyol mixtures on physical and mechanical properties of starch-based edible films. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 2, p. 269–276, 2008.

TANG, H. et al. Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3324–3330, 2011.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, n. 3, p. 71–78, 2003.

TOMITA, R. et al. Qualidade Físicoquímica do pescado marinho refrigerado em diferentes formas de apresentação. **II SIMCOPE-Simpósio de controle do pescado**, p. 1–4, 2006.

VARGAS, M. et al. Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 6, p. 496–511, 2008.

VELICKOVA, E. et al. Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* cv Camarosa) under commercial storage conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 80–92, 2013.

VERMEIREN, L. et al. Developments in the active packaging of foods. **Trends in food science & technology**, v. 10, n. 3, p. 77–86, 1999.

VICENTINI, N. M. Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita. 2003.

VIEIRA, M. G. A. et al. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 3, p. 254–263, 2011a.

VIEIRA, M. G. A. et al. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 3, p. 254–263, 2011b.

VILLADIEGO, A. M. D. et al. Filmes e revestimentos comestíveis na conservação de produtos alimentícios. **Revista Ceres**, v. 52, n. 300, p. 221, 2005.

VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette, Seifen, Anstrichmittel**, v. 72, n. 12, p. 1084–1087, 1970.

WALKER, T. L. et al. Microalgae as bioreactors. **Plant cell reports**, v. 24, n. 11, p. 629–641, 2005.

WIDJAJA, A.; CHIEN, C.-C.; JU, Y.-H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, n. 1, p. 13–20, 2009.

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.

WILHELM, H. M. et al. Starch films reinforced with mineral clay. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, n. 2, p. 101–110, 2003.

WU, J. et al. Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 1, p. 42–51, 2013.

YAMAN, Ö.; BAYOINDIRLI, L. Effects of an Edible Coating and Cold Storage on Shelf-life and Quality of Cherries. **LWT - Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 146–150, 2002.



YANG, Y. et al. A novel method for determining peroxide value of edible oils using electrical conductivity. **Food Control**, v. 39, p. 198–203, 2014.

ZAVAREZE, E. DA R. et al. Development of oxidised and heat–moisture treated potato starch film. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 344–350, 2012.

ZHANG, X. et al. Harvesting algal biomass for biofuels using ultrafiltration membranes. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5297–5304, 2010.

ZHONG, Y.; CAVENDER, G.; ZHAO, Y. Investigation of different coating application methods on the performance of edible coatings on Mozzarella cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 1–8, 2014.

ZHOU, Z. et al. Composition and functional properties of rice. **International journal of food science & technology**, v. 37, n. 8, p. 849–868, 2002.