



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

GILCIANE AMÉRICO ALBUQUERQUE

**APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA E DE FUNDIÇÃO NA
OBTENÇÃO DE EMBALAGENS ATIVAS DE GELATINA DE PEIXE (*Cynoscion
acoupa*) COM ÓLEO ESSENCIAL *Piper divaricatum***

**BÉLEM
2021**



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

GILCIANE AMÉRICO ALBUQUERQUE

**APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA E DE FUNDIÇÃO NA
OBTENÇÃO DE EMBALAGENS ATIVAS DE GELATINA DE PEIXE (*Cynoscion
acoupa*) COM ÓLEO ESSENCIAL *Piper divaricatum***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Universidade Federal do Pará (UFPA) como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Regina Sarkis Peixoto Joele.

Co-orientador: Prof^o. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior.

BÉLEM
2021

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

- A345a Albuquerque, Gilciane Américo.
Aplicação da tecnologia supercrítica e de fundição na obtenção de embalagens ativas de gelatina de peixe (*Cynoscion acoupa*) com óleo essencial *Piper divaricatum* / Gilciane Américo Albuquerque.
— 2021.
94 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof^a. Dra. Maria Regina Sarkis Peixoto Joele
Coorientador(a): Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belém, 2021.
1. Filme ativo. 2. Impregnação por solvente supercrítico. 3. Casting. 4. Atividade antioxidante.. 5. CO2 supercrítico. I. Título.

CDD 664.09

GILCIANE AMÉRICO ALBUQUERQUE

**APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA E DE FUNDIÇÃO NA
OBTENÇÃO DE EMBALAGENS ATIVAS DE GELATINA DE PEIXE (*Cynoscion
acoupa*) COM ÓLEO ESSENCIAL *Piper divaricatum***

Data de Avaliação: ____/____/____

Nota: _____ Conceito: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Regina Sarkis Peixoto Joele
(PPGCTA/ITEC/UFPA - Orientadora)

Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior
(PPGCTA/ITEC/UFPA - Co-orientador)

Profa. Dra. Lúcia de Fátima Henriques Lourenço
(PPGCTA/ITEC/UFPA - Membro interno)

Profa. Dra. Consuelo Lúcia Sousa de Lima
(PPGCTA/ITEC/UFPA - Membro interno)

Dra. Gleice Vasconcelos Pereira do Lago
(PPGCTA/UFPA - Membro externo)

Prof. Dr. Nélcio Teixeira Machado
(PPGEQ/ITEC/UFPA- Membro externo)

Dra. Glauce Vasconcelos Da Silva Pereira
(PPGCTA/UFPA - Membro externo)

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais José Ribamar e Durvalina
por todo amor e dedicação que me
permitiram concretizar sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela proteção que me guia e pelas bênçãos que renovam minha vida;

A minha orientadora Regina pela confiança, presteza e empenho em ajudar em cada momento e em especial pela profissional excepcional que é. A chave do sucesso desse trabalho é você;

Ao meu Co-orientador Raul por toda ajuda, presteza e atenção que foi fundamental para o desempenho desse trabalho;

Aos membros da banca examinadora, Dra. Lúcia, Dra. Consuelo, Dr. Nélcio, Dra. Gleice e Dra. Glauce, pelas contribuições;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Universidade Federal do Pará (UFPA) pela oportunidade de conclusão do doutorado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro de suma importância para a realização desse trabalho.

Aos meus pais Ribamar José e Durvalina que são amor e alicerce em minha vida;

Ao meu esposo Arnaldo que me incentivou e ao meu filho Arthur que me fortaleceu em cada momento dessa trajetória. Amo vocês;

Aos meus irmãos, Jaime, Gilmar, Elton, Dielson, Jaciane e Ribamar Júnior, e minhas cunhadas pelo carinho constante e apoio que a mim é dado;

Ao meu sogro Adinaldo e minha sogra Rosa que foram apoio em cuidar do meu filho com tanto amor nos momentos de ausência; e

Aos meus amigos do Laboratório de Produtos de Origem Animal (LAPOA) e do Laboratório de Extração (LABEX) por toda ajuda, amizade e momentos de diversão vividos juntos.

RESUMO

Filmes ativos produzidos com gelatina da pele de peixe de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) e óleo essencial (OE) *Piper divaricatum* foram obtidos por duas técnicas: impregnação por CO₂ supercrítico (scCO₂) e fundição. Inicialmente foi realizado o processo de impregnação do OE no filme de gelatina utilizando o CO₂ como solvente supercrítico, em autoclave a 35 ° C, nas pressões de 100, 150 e 200 bar e tempos de 60, 90 e 120 min. O filme ativo que apresentou maior percentual de inibição de atividade antioxidante (IAA%) foi obtido a 100 bar e 60 min (41,63±1,6%). A microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou que o OE apresentou distribuição heterogênea no filme, confirmando a impregnação. A impregnação por scCO₂ resultou em um filme com menores resistência à tração e estabilidade térmica, maior flexibilidade e opacidade quando comparado ao controle, indicando o potencial dessa técnica para obtenção de embalagens ativas para produtos alimentícios. Após a determinação do melhor parâmetro do processo de impregnação, foram comparadas as concentrações de 10%, 20% e 30% do OE no filme de gelatina pelas técnicas de fundição e impregnação por scCO₂. Os filmes obtidos com a adição de 20% (71,97±1,71) e 30% (79,17±1,01) de OE produzidos por fundição apresentaram as maiores retenções do IAA%. Os filmes elaborados por impregnação por scCO₂ apresentaram menor atividade antioxidante, mas que foi melhorada com o aumento do teor de OE de 20% (23,57±1,45) para 30% (33,66±2,42). Através das imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV) observou-se gotículas de óleo com distribuição heterogênea em filmes impregnados por scCO₂ e superfície homogênea pela técnica de fundição. Os filmes impregnados com scCO₂ se mostraram transparentes, resistentes à tração, elásticos e com maior estabilidade térmica. Enquanto, os filmes produzidos por fundição apresentaram maior resistência à umidade e maior proteção a luz UV. A técnica de fundição mostrou maior potencial para a produção de embalagens ativas, pois o filme apresentou melhor potencial antioxidante com a incorporação de OE e uso de emulsificante na solução do filme. A impregnação por scCO₂ apresentou potencial para obtenção do filme ativo, entretanto novos estudos devem ser realizados para aprimorar as limitações de retenção de óleo no filme encontradas neste estudo.

Palavras-Chave: Impregnação por solvente supercrítico; filme ativo; *casting*; CO₂ supercrítico; atividade antioxidante.

ABSTRACT

Active films produced with gelatin from the skin of hake fish (*Cynoscion acoupa*) and essential oil (EO) *Piper divaricatum* were obtained by two techniques: impregnation by supercritical CO₂ (scCO₂) and *casting*. Initially, the process of impregnating the EO in the gelatin film was carried out using CO₂ as a supercritical solvent, in an autoclave at 35 ° C, at pressures of 100, 150 and 200 bar and times of 60, 90 and 120 min. The active film that showed the highest percentage of inhibition of antioxidant activity (IAA%) was obtained at 100 bar and 60 min (41.63±1.6%). Scanning electron microscopy (SEM) showed that the EO presented heterogeneous distribution in the film, confirming the impregnation. The scCO₂ impregnation resulted in a film with lower tensile strength and thermal stability, greater flexibility and opacity when compared to the control, indicating the potential of this technique to obtain active packaging for food products. After determining the best parameter of the impregnation process, the concentrations of 10%, 20% and 30% of the EO in the gelatin film were compared by the *casting* and impregnation techniques by scCO₂. The films obtained with the addition of 20% (71.97±1.71) and 30% (79.17±1.01) of EO produced by *casting* showed the highest retentions of the IAA%. Films made by scCO₂ impregnation showed lower antioxidant activity, but this was improved with increasing EO content from 20% (23.57±1.45) to 30% (33.66±2.42). Through scanning electron microscopy (SEM) images, oil droplets with heterogeneous distribution were observed in films impregnated by scCO₂ and homogeneous surface by the *casting* technique. The films impregnated with scCO₂ proved to be transparent, resistant to traction, elastic and with greater thermal stability. Meanwhile, the films produced by *casting* showed greater resistance to moisture and greater protection from UV light. The *casting* technique showed greater potential for the production of active packaging, as the film showed better antioxidant potential with the incorporation of EO and the use of emulsifier in the film solution. Impregnation by scCO₂ showed potential to obtain the active film, however further studies should be carried out to improve the limitations of oil retention in the film found in this study.

Keywords: Supercritical solvent impregnation, active film, *casting*, supercritical CO₂, antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1. Pescada amarela (<i>Cynoscion acoupa</i>)	18
---	----

CAPITULO II

Figura 1. Representação esquemática do sistema ISS	48
Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de gelatina: a) FG-Controle, b) FG-CO ₂ e c) FG-Óleo (100 bar/60 min)	54
Figura 3. Espectros de FTIR dos filmes FG-Controle, FG-CO ₂ e FG-Óleo	55
Figura 4. Curvas de ATG de filmes FG-Controle, FG-CO ₂ e FG-Óleo	61

CAPITULO III

Figura 1. Representação esquemática do sistema ISS	73
Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de gelatina: a) FG-Controle, b) FG-Fundição 30% e c) FG-CO ₂ 30%	79
Figura 3. Espectros de FTIR dos filmes FG-Controle, FG-Fundição 30% e FG-CO ₂ 30%	80
Figura 4. Curvas de ATG de filmes FG-Controle, FG-Fundição 30% e FG-CO ₂ 30%	85

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II

Tabela 1. Atividade antioxidante dos filmes de gelatina impregnados com óleo essencial <i>Piper divaricatum</i>	52
Tabela 2. Propriedades mecânicas e espessura dos filmes FG-Controle, FG-CO ₂ e FG-Óleo	58
Tabela 3. Parâmetros de cor (L*, a*, b* e ΔE*) dos filmes FG-Controle, FG-CO ₂ e FG-Óleo	59
Tabela 4. Transmissão de luz e transparência dos filmes FG-Controle, FG-CO ₂ e FG-Óleo	60
Tabela 5. Temperaturas de degradação térmica (Td, °C) e perda de peso (Δw, %) de filmes FG-Controle, FG-CO ₂ 30% e FG-Óleo	61

CAPITULO III

Tabela 1. Atividade antioxidante do FG-Controle e dos filmes FG-Fundição e FG-CO ₂ nas concentrações de óleo 10%, 20% e 30%	77
Tabela 2. A resistência a tração (RT), % alongação (E%), espessura e solubilidade dos FG-Controle, FG-Fundição 30% e FG-CO ₂ 30%	83
Tabela 3. Parâmetros de cor (L*, a*, b* e ΔE*) dos filmes FG-Controle, FG-CO ₂ 30% e FG-Fundição 30%	83
Tabela 4. Transmissão de luz e transparência dos filmes FG-Controle, FG-CO ₂ 30% e FG-Fundição 30%	84
Tabela 5. Temperaturas de degradação térmica (Td, °C) e perda de peso (Δw, %) de filmes FG-Controle, FG-Fundição 30% e FG-CO ₂ 30%	86

Sumário

TEXTO INTEGRADOR	14
OBJETIVOS	16
OBJETIVO GERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
CAPITULO I: REFERENCIAL TEÓRICO	17
1. RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE PESCA	17
2. GELATINA	19
3. FILMES BIODEGRADÁVEIS	21
4. FILMES BIODEGRADÁVEIS ATIVOS	22
5. TÉCNICAS PARA ELABORAÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS	24
6. IMPREGNAÇÃO POR CO ₂ SUPERCRÍTICO	26
7. <i>Piper divaricatum</i>	29
REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO II: Impregnação de CO₂ supercrítico do óleo essencial <i>Piper divaricatum</i> em filme de gelatina de pele de peixe (<i>Cynoscion acoupa</i>)	43
Resumo	43
1 INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAIS E MÉTODOS	46
2.1 MATÉRIA-PRIMA	46
2.2 EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Piper divaricatum</i>	47
2.3 EXTRAÇÃO DA GELATINA	47
2.4 ELABORAÇÃO DE FILME DE GELATINA	47
2.5 IMPREGNAÇÃO COM SOLVENTE SUPERCRÍTICO (ISS) DE ÓLEO ESSENCIAL EM FILME DE GELATINA	47
2.6 ANÁLISES DOS FILMES	49
2.6.1 Atividade antioxidante do óleo essencial e dos filmes	49
2.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	50
2.6.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	50
2.6.4 Propriedades mecânicas e espessura	50
2.6.5 Cor, transmissão de luz e transparência de filmes	50
2.6.6 Análise termogravimétrica (ATG).....	51
2.6.7 Análise estatística	51

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS FILMES DE GELATINA COM ÓLEO ESSENCIAL	51
3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	53
3.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	55
3.4. PROPRIEDADES MECÂNICAS E ESPESSURA	57
3.5 COR, TRANSMISSÃO DE LUZ E TRANSPARÊNCIA DE FILMES	59
3.6 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (ATG)	60
4 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	63
CAPÍTULO III: Estudo dos métodos de fundição e impregnação por CO₂ supercrítico de óleo essencial <i>Piper divaricatum</i> em filmes de gelatina de peixe (<i>Cynoscion acoupa</i>)	69
Resumo	69
1 INTRODUÇÃO	69
2 MATERIAIS E MÉTODOS	71
2.1 MATÉRIA PRIMA	71
2.2 OBTENÇÃO DA GELATINA	71
2.3 FILME DE GELATINA COM ÓLEO ESSENCIAL POR MÉTODO DE FUNDIÇÃO	72
2.4 FILME DE GELATINA COM IMPREGNAÇÃO POR scCO ₂ DE ÓLEO ESSENCIAL	72
2.5 ANÁLISE DOS FILMES	74
2.5.1 Atividade antioxidante dos filmes.....	74
2.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	74
2.5.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	74
2.5.4 Propriedades mecânicas e espessura	75
2.5.5 Solubilidade.....	75
2.5.6 Análise de cor, transmissão de luz e transparência.....	75
2.5.7 Análise termogravimétrica (ATG).....	76
2.5.8 Análise estatística	76
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS FILMES	76
3.2 MEV	79
3.4. PROPRIEDADES MECÂNICAS, ESPESSURA E SOLUBILIDADE	81
3.5 COR, TRANSMISSÃO DE LUZ E TRANSPARÊNCIA DE FILMES	83

3.6. <i>ATG</i>	85
4 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	87
CONCLUSÃO GERAL	94

TEXTO INTEGRADOR

Filmes biodegradáveis são embalagens à base de biopolímeros, obtidos de fontes renováveis, como alternativas para minimizar o impacto ambiental gerado por resíduos de embalagens plásticas, oriundas do petróleo. A gelatina, um polipeptídeo derivado do colágeno, é um biopolímero muito estudado para produção desses filmes, podendo ser obtida de pele de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*), sendo uma forma de reaproveitamento dos resíduos gerados pelo processo de filetagem, evitando o descarte inadequado no ambiente. Esses filmes podem ainda ser carreadores de propriedades funcionais, isto é, filmes ativos que interagem com os alimentos, aumentando a funcionalidade das embalagens e sua vida útil. O óleo essencial *Piper divaricatum* possui metabólitos secundários com ação antioxidante e antimicrobiana que podem ser utilizados em aplicações para embalagens ativas.

A técnica de fundição ou *casting* é a mais usada para produção desses filmes, e que consiste na secagem da solução filmogênica (SF). A incorporação de óleo essencial (OE) na SF foi realizada por emulsificação da solução aquosa contendo o polímero, com uso de emulsificante. Em paralelo, a técnica de impregnação por solvente supercrítico (ISS) de aditivos em polímeros, por meio de fluido supercrítico como o CO₂, vem sendo muito utilizada. O CO₂ atua como veículo de transporte para o aditivo a ser impregnado, plastificando e aumentando o volume livre da matriz polimérica, facilitando a difusão do aditivo, com liberação do CO₂ no final do processo. Portanto, é viável a impregnação por CO₂ supercrítico para incorporar óleo essencial em filmes de gelatina para obtenção de embalagens ativas com ação antioxidante.

Nesse sentido, a tese de doutorado intitulada “Aplicação da tecnologia supercrítica e de fundição na obtenção de embalagens ativas de gelatina de peixe de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) com óleo essencial *Piper divaricatum*” foi desenvolvida com a finalidade de avaliar o uso da técnica de impregnação por CO₂ supercrítico (scCO₂) para incorporar óleo essencial em filme de gelatina para produção de embalagens ativas de alimentos com propriedade antioxidante.

Esse estudo foi dividido em três capítulos. O Capítulo I é uma revisão de literatura com a finalidade de dar suporte à pesquisa realizada e entre os temas estão: subprodutos da indústria da pesca, gelatina, filmes biodegradáveis, técnicas para elaboração de filmes biodegradáveis, impregnação por CO₂ supercrítico e *Piper divaricatum*.

O Capítulo II apresenta o artigo publicado “Impregnação por CO₂ supercrítico do óleo essencial *Piper divaricatum* em filme de gelatina de pele de peixe (*Cynoscion acoupa*)”. Nesse estudo foram avaliados os parâmetros do processo de impregnação por solvente supercrítico do OE no filme de gelatina usando o CO₂, como fluido supercrítico, em autoclave a 35 °C, nas pressões de 100, 150 e 200 bar, e tempos de 60, 90 e 120 min. Além disso, foi avaliada a amostra controle (filme de gelatina) e o filme pressurizado sem o óleo para verificar possíveis mudanças no filme submetido ao CO₂ supercrítico. O percentual de inibição de atividade antioxidante (IAA%) foi usado para avaliar a melhor condição dos parâmetros do processo de impregnação do óleo no filme de gelatina. Nos filmes controle, pressurizado (sem OE) e com óleo (> IAA%) foram avaliadas a superfície morfológica, as propriedades estruturais, térmicas e mecânicas, além da cor, transmissão de luz e transparência. Nesse Capítulo foi obtido o melhor parâmetro do processo de impregnação por solvente supercrítico para o filme ativo. Portanto, foi necessário averiguar a incorporação do OE em diferentes concentrações (10%, 20% e 30%) pela técnica convencional (fusão) e pela impregnação por CO₂ supercrítico e analisar o potencial antioxidante e suas alterações nos filmes.

No Capítulo III foi elaborado um artigo sobre a “Estudo dos métodos de fusão e impregnação por CO₂ supercrítico de óleo essencial *Piper divaricatum* em filmes de gelatina de peixe (*Cynoscion acoupa*)”. O percentual de inibição de atividade antioxidante foi usado para avaliar a incorporação do óleo nos filmes elaborados. Os filmes com maior atividade antioxidante, obtidos por fusão e impregnação por CO₂ supercrítico, com o mesmo percentual de óleo, foram avaliadas suas propriedades mecânicas, térmicas, estruturais, morfológicas, ópticas e solubilidade em água.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Desenvolver filmes ativos de gelatina da pele de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) com óleo essencial *Piper divaricatum*, pelas técnicas de fundição e de impregnação por CO₂ supercrítico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer os parâmetros de pressão e tempo de impregnação por scCO₂ do óleo essencial em filmes de gelatina;
- Estudar a atividade antioxidante do óleo essencial *Piper divaricatum* e dos filmes elaborados;
- Analisar as propriedades mecânicas, térmicas, estruturais, morfológicas e ópticas dos filmes controle, filmes pressurizados por scCO₂ com e sem o óleo;
- Elaborar filmes de gelatina com diferentes concentrações de óleo essencial *Piper divaricatum* pelas técnicas de fundição e de impregnação por scCO₂;
- Estudar a atividade antioxidante dos filmes incorporados com as diferentes concentrações de óleo por fundição e impregnação por scCO₂;
- Analisar as propriedades mecânicas, térmicas, estruturais, morfológicas, ópticas e solubilidade em água do filme controle e filmes com óleo obtidos por fundição e impregnação por scCO₂.

CAPITULO I: REFERENCIAL TEÓRICO

1. RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE PESCA

O Brasil já foi considerado o país com maior potencial para o desenvolvimento da pesca e aquicultura. Ocupa a 13ª posição na produção de peixes em cativeiro e é o 8º na produção de peixes de água doce. Estima-se que a produção global de peixes tenha atingido cerca de 179 milhões de toneladas em 2018. O consumo global de peixes em alimentos aumentou a taxa média anual em 3,1% de 1961 a 2017, e é superior ao de todos os outros animais e alimentos proteicos (aumentou 2,1% ao ano), ressaltando seu papel crítico na segurança alimentar e nutricional global (FAO, 2020).

Segundo a FAO (2020), desde 2014 não há estatística pesqueira oficial no Brasil e os dados são obtidos por levantamentos realizados pela instituição e seus parceiros. O estado do Pará foi o maior produtor do Brasil de pescado oriundo do extrativismo em 2011, com um total de 142,9 mil toneladas (BRASIL, 2013).

A exemplo dos demais processos produtivos, a cadeia pesqueira gera grande volume de resíduos, especificamente no beneficiamento da filetagem, uma vez que grande parte das indústrias aproveitam apenas o filé do peixe e/ou o que chamam de “corpo limpo”. Os resíduos gerados no processo de filetagem do pescado (cabeça, vísceras, pele, coluna vertebral, nadadeira, escamas e restos de carne) costumam representar 65% do peso vivo do pescado, sendo utilizado apenas 35% (SOUZA E INHAMUNS, 2011; MEDEIROS et al., 2019).

Os resíduos gerados pela indústria pesqueira são fonte de poluição para o meio ambiente, sendo necessária uma destinação ecologicamente correta para esses resíduos a fim de melhorar a sustentabilidade (VALE et al., 2020). Esses resíduos podem ser reaproveitados como excelente matéria-prima para preparação de alimentos ricos em proteínas e de baixo valor comercial, que além de melhorar a qualidade do processamento das indústrias de pesca, ajuda a reduzir os problemas ambientais relacionados ao seu descarte ao meio ambiente (BUENO et al., 2011).

Neste contexto, a filetagem de espécies de peixes nas indústrias amazônicas, mercados e supermercados gera uma quantidade considerável de peles, que são descartadas como resíduos. Uma alternativa de aproveitamento comercial é a produção de gelatina como subproduto da pele de peixe (SILVA; LOURENÇO E PENA, 2017), que pode ser usada como matéria-prima para elaboração de filmes biodegradáveis.

Uma das espécies de peixes muito comercializada na região Norte do Brasil e, consequentemente, responsável por intenso acúmulo de resíduo é a pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) (Figura 1). Ela é comercializada *in natura* e na forma processada, como filé congelado, e é o ceniídeo brasileiro de maior valor agregado, sendo vendido nas principais redes de supermercados do Pará (BARBOSA et al., 2020).

De acordo com o levantamento realizado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura, a pescada amarela está entre as seis espécies com maior quantidade de resíduos que correspondem a 44,1% da produção pesqueira continental do Brasil. A espécie possui grande destaque em nível nacional, tanto na pesca marítima como na continental (BRASIL, 2010). É uma das mais exploradas na costa norte do Brasil representando 19% dos desembarques do Estado do Pará (MOURÃO et al., 2009).

A pescada amarela é uma espécie demersal, pertencente à família Sciaenidae, que ocorre em águas rasas tropicais e subtropicais da costa atlântica da América do Sul, apresentando tolerância para as águas salobras. E no Brasil ocorre em todo o litoral (SZPILMAN, 2000). Seu comprimento máximo é de 100 cm e médio de 50 cm de comprimento. Possui corpo alongado, pouco comprimido; a pele com coloração cinza prateada, com dorso mais escuro; ventre mais claro, com amplas áreas amarelas. Sua carne é considerada de excelente qualidade (LESSA E NÓBREGA, 2000; BRASIL, 2016).

A captura da pescada amarela ocorre o ano todo, entretanto são intensificadas no mês de maio estendendo-se até dezembro, período de transição chuvoso-seco (maio a junho) e seco propriamente dito (julho a dezembro) (MOURÃO, 2007).



Figura 1. Pescada amarela (*Cynoscion acoupa*).

Fonte: Mourão (2007).

2. GELATINA

A gelatina é um material proteico hidrofílico, biocompatível e biodegradável. Muito utilizado nas indústrias alimentícia, cosmética, biomédica, farmacêutica e fotográfica como agente gelificante, estabilizador, espessante, emulsionante, agente microencapsulante e formador de filmes (BORAN E REGENSTEIN, 2010). A gelatina tem alto teor de aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina. Possui uma mistura de cadeias simples e duplas de caráter hidrofílico. É um agente formador de gel de proteína termorreversível, tendo um ponto de fusão (35–37 °C) significativo para aplicações comestíveis, biodegradáveis e farmacêuticas (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011; MARIOD e ADAM, 2013). É produzido por desnaturação térmica combinada de ácido ou base do colágeno fibroso e insolúvel presente nos tecidos animais (ossos e peles), e, geralmente, obtida de suínos e bovinos (KARIM E BHAT, 2009; KIM e MENDIS, 2006).

O uso de gelatina de peixe na indústria de alimentos ainda é limitado em comparação com a gelatina de origem bovina e suína, possivelmente devido à presença de odor de peixe e também pela percepção de desempenho inferior na capacidade de gelificação. Isso pode ser devido a fatores intrínsecos, como a composição química da matéria-prima do peixe, que pode variar entre as espécies, e a fatores ambientais, como as condições de temperatura do seu habitat natural (NITSUWAT et al., 2021).

As propriedades mais importantes usadas para caracterizar gelatinas comerciais e para determinar onde a gelatina pode ser usada são geralmente a resistência ao gel, o ponto de fusão e a viscosidade (KOLODZIEJSKA et al., 2004). Essas propriedades são fortemente influenciadas por dois fatores principais, isto é, as características da fonte da gelatina e os processos de produção (SHYNI et al., 2014).

As propriedades do gel da gelatina são principalmente regidas pelo teor de aminoácidos e distribuição de peso molecular, comprimento de cadeias α , β e γ . O conteúdo de aminoácidos é particularmente importante em relação à força do gel de gelatina e ao ponto de fusão devido à rigidez de seus grupos R, os aminoácidos fornecem rigidez às estruturas de tripla hélice dos géis e estabilizam a conformação ordenada quando a gelatina forma a rede de gel durante a gelificação (MUYONGA; COLE E DUODU, 2004).

A gelatina a partir de animais de sangue quente (por exemplo, bovino e suíno) mostra perfil diferente de aminoácidos e resistência do gel em comparação com a gelatina de peixe de água fria (JOLY-DUHAMEL; HELLIO E DJABOUROV, 2002). Em geral, as gelatinas das

peles de peixe de água fria têm aplicações limitadas, principalmente devido à menor força e estabilidade do gel com temperaturas inferiores de gelificação e fusão em comparação com as contrapartes de mamíferos. Isto é regido pelo menor conteúdo de aminoácido (prolina e hidroxiprolina) (KITTIPIHATTANABAWON et al., 2010).

A gelatina de peixes de água fria apresentam menor teor de aminoácidos do que peixes de água quente, que estão mais próximo da gelatina de mamíferos (HAUG; DRAGET E SMIDSROD, 2004), consequentemente, apresentam melhores propriedades funcionais. Embora comparações estritas sejam difíceis, uma vez que as metodologias de extração podem variar consideravelmente de um trabalho para outro (KITTIPIHATTANABAWON et al., 2016; DÍAZ-CALDERON et al., 2017). A gelatina de peixe de água fria é caracterizada, geralmente, com baixas temperaturas de gelificação e fusão e resistência ao gel inferior em contraste com os dados relatados para espécies de águas quentes (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

Os resultados da meta-análise realizada por NITSUWAT et al. (2021) sugeriram que a gelatina de pele de peixe de água quente podem fornecer força de gel mais semelhante à da gelatina bovina, podendo ser um substituto mais adequada para aplicações de gelificação de alimentos quando comparado as gelatina de peixe de água fria. Estas gelatinas necessitariam de altas concentrações para obter a mesma força de gel da gelatina de mamíferos, o que poderia aumentar o custo para aplicações industriais.

Por outro lado, os protocolos de extração de gelatina incluem em geral o uso de produtos químicos ácidos ou alcalinos para hidrólise a alta temperatura (50-80 °C). E verificou-se que isso afeta significativamente o peso molecular e o ponto isoelétrico da gelatina (JOLY-DUHAMEL; HELLIO E DJABOUROV, 2002; KARIM E BHAT, 2009).

Diante disso, podem ser obtidos dois tipos de gelatina, dependendo do procedimento de pré-tratamento, e conhecidos comercialmente como gelatina de tipo A (ponto isoelétrico a pH ~ 8-9) e gelatina do tipo B (ponto isoelétrico a pH ~ 4-5) obtida sob condições de pré-tratamento ácido e alcalino, respectivamente. As aplicações industriais exigem um ou outro tipo de gelatina, dependendo do grau de reticulação do colágeno na matéria-prima. Devido à instabilidade ácida da reticulação em colágenos imaturos, como em peles de peixe, um tratamento com ácido razoavelmente leve é suficiente para efetuar solubilização de colágeno (MONTERO et al., 1990; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

Há vários estudos com a obtenção de gelatina a partir de fontes marinhas como filhote (SILVA et al., 2017), salmão (DÍAZ-CALDERON et al., 2017), PEIXE-FACA-PALHAÇO

(KITTIHATTANABAWON et al., 2016), carpa prateada (WU et al., 2017), atum patudo (FENG et al., 2021), esturjão (RASHIDUL ISLAM et al., 2021) e pescada amarela (SILVA et al., 2018) promovendo a valorização dos resíduos de processamento de alimentos.

3. FILMES BIODEGRADÁVEIS

A principal força motriz para o crescimento da indústria mundial de alimentos é o alcance e a gama de tecnologia de preservação de alimentos e extensão de vida útil (SADAKA et al., 2013). Neste contexto, os filmes biodegradáveis recentemente ganharam mais interesse pela conservação de alimentos devido aos resultados promissores obtidos através de suas aplicações, principalmente com o intuito de melhorar a qualidade dos produtos alimentícios. Vários trabalhos alcançaram resultados promissores em peixes, carnes e derivados (UMARAW et al., 2020), frutas e legumes (TEMIZ E ÖZDEMİR, 2021) e alimentos fritos e congelados (BERMÚDEZ-ORIA et al., 2019; NILSUWAN et al., 2021).

É importante observar a diferença entre sistemas de embalagem passivos, ativos e inteligentes. Um sistema de *embalagem passiva* atua apenas como uma barreira física entre o produto e o meio ambiente. Por outro lado, *a embalagem ativa* refere-se a um material que interage ativamente com o produto embalado, modificando suas condições. É projetado para incorporar deliberadamente componentes ativos que podem absorver substâncias indesejadas (O₂, CO₂, H₂O, etileno, etc.) ou serem liberados para a atmosfera interna da embalagem ou o ambiente em torno dela, atuando como agentes antimicrobianos e/ou antioxidantes, agentes aromatizantes, etc. Finalmente, *embalagens inteligentes* são sistemas que possuem materiais que são capazes de monitorar as condições dos alimentos embalados ou o meio ambiente que o rodeia, detectando e/ou registrando mudanças externas ou internas no sistema produto-embalagem-ambiente, podendo comunicar essas informações (por exemplo, umidade, temperatura e indicadores de crescimento microbiano, entre outros) (COMMISSION REGULATION (EU) 450/2009).

Os filmes biodegradáveis ou biofilmes são definidos como camadas finas a partir de materiais biológicos adequado ao consumo (GUILBERT; GONTARD E GORRIS, 1996) que podem prolongar a vida útil dos alimentos atuando como barreiras à umidade, a volatilização de compostos, oxigênio, dióxido e potenciadores das propriedades mecânicas e biológicos na resistência contra fungos e bactérias (OJAGH et al., 2010; SALLEH; MUHAMMAD E PAHLAWI, 2014; KIM; BEAK E SONG, 2018).

A matéria-prima para elaboração de filmes biodegradáveis pode ser de origem animal ou vegetal como polissacarídeos, proteínas e lipídios, ou formarem compostos com a combinação de ambos. A escolha da matéria-prima depende fundamentalmente das características do produto a ser revestido e do principal objetivo almejado com o revestimento aplicado (ASSIS E BRITO, 2014).

Entre as proteínas, a gelatina é amplamente utilizada na fabricação de filmes biodegradáveis devido a excelente capacidade de formação de filme, de formar redes e induzir plasticidade e elasticidade (LIMPISOPHON; TANAKA E OSAKO, 2010; ZAVAREZE et al., 2016). Enquanto isso, é a única capaz de formar géis termorreversíveis com ponto de fusão próximo da temperatura corporal, característica particularmente significativa em relação aos agentes gelificantes à base de carboidratos (BORAN E REGENSTEIN, 2010).

Os filmes à base de gelatina são biocompatíveis e apresentam excelentes propriedades de barreira contra gases e compostos voláteis, óleos e luz UV (TONGNUANCHAN et al., 2016), e ainda, boa resistência mecânica e alta elasticidade. No entanto, têm baixa barreira ao vapor de água e alta sensibilidade à umidade ambiente devido à natureza hidrofílica da gelatina (RAO, 2007; THEERAWITAYAART et al., 2019).

Assim, muitos estudos investigaram a modificação de filme à base de gelatina para aprimorar suas propriedades físicas ou tornar o filme ativo pela incorporação de agentes bioativos usando nanopartículas de negro de fumo vegetal (DING et al., 2017), galato de epigallocatequina (NILSUWAN; BENJAKUL E PRODPRAN, 2018), ácido linoléico oxidado (THEERAWITAYAART et al., 2019), óleo de palma e óleo essencial de manjerição (TONGNUANCHAN et al., 2016), ácido cítrico (URANGA et al., 2019), nanopartículas bimetalicas de Ag-Cu (ARFAT et al., 2017), complexos de inclusão de β -ciclodextrina-timol (LI et al., 2018), compostos fenólicos (LE et al., 2018) e bionanocompósitos de gelatina-celulose e nanocristalinos (LEITE et al., 2020).

4. FILMES BIODEGRADÁVEIS ATIVOS

Embalagens ativas biodegradáveis estão lentamente ganhando atenção como uma alternativa para polímeros derivados do petróleo, devido à sua versatilidade e natureza ecologicamente correta. Além de possuírem substâncias antimicrobiana e/ou antioxidante que

podem prolongar a vida útil dos produtos alimentares, contribuindo para sua qualidade e segurança (ARFAT et al., 2017).

Vários trabalhos têm sido documentados com uso de extratos e óleos essenciais de plantas por serem carreadores de agentes naturais antimicrobianos e antioxidantes, cada vez mais percebidos pelos consumidores como conservantes mais saudáveis, tornando uma alternativa interessante para aditivos sintéticos (SUPPAKUL et al., 2008; TONGNUANCHAN, BENJAKUL E PRODPRAN, 2012).

Em particular, os óleos essenciais têm atraído mais atenção por sua aplicação na fabricação e armazenamento de alimentos, devido aos seus benefícios antioxidantes e/ou antimicrobianos naturais e possuírem o status GRAS (geralmente reconhecido como seguro), conforme definido pela FDA (Food and Drug Administration).

Os óleos essenciais são misturas complexas de metabólicos secundários, extraídos de plantas aromáticas, caracterizados por serem líquidos hidrofóbicos, voláteis, de aroma intenso e incolores ou ligeiramente amarelados, poucos são os quais apresentam cor. São fontes ricas de diferentes compostos bioativos, como terpenos, terpenóides e componentes aromáticos derivados de fenol (BAKKALI, 2008).

Apesar do grande potencial dos óleos essenciais, seu uso na conservação dos alimentos permanece limitado principalmente devido ao seu intenso aroma, problemas de toxicidade e possíveis mudanças nas propriedades sensoriais do alimento (SANCHEZ-GONZALEZ et al., 2011). Além disso, na maioria, eles são muito instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais (SIMÕES et al., 2007).

Entretanto, ao se fazer uso de filmes biodegradáveis para transportar óleos essenciais, a volatilização deste composto é limitada e sua liberação controlada através do encapsulamento do OE na matriz polimérica, o que pode reduzir o impacto negativo desses ingredientes (BONILLA et al., 2013).

A incorporação de óleos essenciais nos filmes afeta a continuidade da matriz polimérica, levando a mudanças físicas, dependendo das interações específicas dos componentes polímero-óleo. Além disso, proporcionam vantagens adicionais, como proteção contra o crescimento microbiano e/ou oxidação lipídica. A composição do óleo e as interações específicas com o polímero determinam sua eficácia como ingrediente ativo (ATARÉS E CHIRALT, 2016; LEE; LEE E SONG, 2016; MARTUCCI et al., 2015).

Devido o oxigênio ser responsável por muitos processos de degradação em alimentos, tais como oxidação lipídica, que resulta na geração de saborizantes, alterações de cor e perda de nutrientes, reação enzimática e crescimento microbiano, que pode comprometer a segurança alimentar (LE et al., 2018), há uma constante busca pela produção de filmes ativos que evitem os efeitos negativos do oxigênio com a incorporação de óleos essenciais em filmes de gelatina: óleo de orégano (MARTUCCI et al., 2015), de cânhamo e sálvia (COZMUTA et al., 2015), de folha de laranja (ALPARSLAN E BAYGAR, 2017), de cravo da índia (LEE; LEE E SONG, 2016) e óleo de *Zipiphora clinopodioides* e extrato etanólico de sementes de uva (SHAHBAZI, 2017) que mostraram ser uma boa alternativa aos conservantes de alimentos naturais como inibidor de crescimento microbiano e/ou oxidante.

5. TÉCNICAS PARA ELABORAÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS

Na elaboração de filmes à base de proteínas são usadas uma solução composta basicamente por três componentes principais: proteína, plastificante e solvente. As proteínas nativas devem ser desnaturadas através de tratamentos por calor, pela adição de ácido ou base e/ou solvente para permitir maior extensão de sua estrutura. Maior extensão permite maior interação e associação entre cadeias de proteínas, cuja força interativa (por interações eletrostáticas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio, ligações covalentes e dissulfeto) gera a matriz coesa do filme de proteínas (DHALL, 2013).

Os diferentes métodos de processamento influenciam nas propriedades do filme devido ao rearranjo diferente das cadeias de proteínas durante o processo de formação do filme, como consequência das diferentes temperaturas e tempos de processamento empregados. Esses parâmetros de processamento afetam interações intra e intermoleculares entre cadeias de proteínas e, portanto, propriedades do filme (GARRIDO et al., 2016).

As técnicas usadas para desenvolver filmes de base biológica são semelhantes às utilizadas no processamento de plásticos sintéticos, incluindo métodos úmidos e secos. Os métodos úmidos compreendem fundição com solvente (uma técnica comumente usada em escala de laboratório), enquanto que nos métodos secos, os filmes biodegradáveis geralmente são comprimidos, moldados ou extrudados, gerando um termoplástico (CALVA-ESTRADA et al., 2019).

Esses processamentos à seco normalmente incluem moldagem por prensagem à quente ou por compressão, bem como técnicas de fusão e extrusão (GUERRERO et al., 2010). A extrusão utiliza um ou dois parafusos Archimedes rotativos, montados em um barril, a fim de aumentar progressivamente a pressão, misturar e empurrar os ingredientes necessários para fabricar o polímero comercial através de uma matriz onde a expansão pode ocorrer. A moldagem por compressão e extrusão são particularmente adequadas para produção em larga escala devido à sua simplicidade e menor consumo de tempo e de energia (GARRIDO et al., 2016).

Entretanto, existem estudos limitados sobre o uso dessas técnicas para produzir filmes biodegradáveis, especialmente a partir de gelatina. Isso ocorre porque o comportamento e a interação química dos ingredientes alimentares durante a extrusão são bastante difíceis de entender e muitos parâmetros de processamento precisam ser considerados (NUR HANANI et al., 2012). Filmes de gelatina foram elaborados por extrusão e compressão (KRISHNA et al., 2012) e por extrusão de parafuso duplo e co-rotação (NUR HANANI et al., 2012), usando temperaturas entre 90°C a 120 °C. URANGA et al. (2018) produziu filme ativo de gelatina com antocianinas através de moldagem por compressão usando temperaturas mais amenas para evitar a degradação do ativo e obteve bons resultados.

O método mais comumente usados para desenvolver filmes à base de proteínas em escala laboratorial é o processo por via úmida ou a moldagem da solução, conhecido como fundição ou *casting* (GARRIDO et al., 2016). Ele é baseado na dispersão ou solubilização de proteínas em um meio solvente (GUERRERO et al., 2010). Compreende o preparo de uma solução coloidal da macromolécula e aditivos, aplicação dessa solução num suporte adequado, seguida de secagem em condições estritamente controladas (MONTERREY-QUINTERO E SOBRAL, 2000). Não requer equipamentos específicos e consome menos matéria-prima durante a fabricação.

Ainda sobre seu processo, os materiais do filme devem ser dispersos e dissolvidos em um solvente como água, álcool, mistura de água e álcool ou uma mistura de outros solventes. Plastificantes, agentes antimicrobianos, minerais, vitaminas, cores ou sabores podem ser adicionados nesse processo. O ajuste do pH e / ou aquecimento das soluções pode ser feito para o polímero específico para facilitar a dispersão. A solução de filme é então moldada e seca a uma temperatura e umidade relativa desejadas para obter filme independente (DHALL, 2013).

Em geral, para incorporação de óleos essenciais em filmes de gelatina é usada a técnica de fundição ou *casting*, que consiste na produção da solução filmogênica de gelatina e plastificante com adição de emulsificantes ou surfactantes, para proporcionar uma dispersão estável e uniforme do óleo essencial na solução, que é vazada em placas e então seca por evaporação do solvente.

6. IMPREGNAÇÃO POR CO₂ SUPERCRÍTICO

A impregnação de compostos ativos em matrizes poliméricas usando dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) é uma técnica bem conhecida, sendo estudada e proposta para várias aplicações: formular materiais controlados de liberação de fármaco (ROJAS et al., 2015); impregnação de compostos antifúngicos em madeira (KJELLOW E HENRIKSEN et al., 2009); impregnação de agentes antimicrobianos naturais em andaime (FANOVIK et al., 2013); impregnação drogas anti-inflamatórias e antibióticas em lentes intraoculares comerciais (BOULEDJOUIDJA et al., 2017) e recentemente usada para produzir embalagens de alimentos com propriedades antimicrobianas e/ou antioxidantes (CEJUDO BASTANTE et al., 2017).

O interesse na impregnação de fluidos supercríticos de materiais poliméricos decorre, principalmente, da oportunidade de aproveitar as propriedades específicas do fluido supercrítico, devido sua alta densidade, baixa viscosidade, difusividade superior à dos líquidos, baixa tensão interfacial e facilidade de recuperação de solvente para a preparação de novos materiais poliméricos. Devido à combinação única dessas propriedades, verificou-se ser viável a impregnação de substâncias ativas em matrizes poliméricas (KIKIC E VECCHIONE, 2003).

Os fluidos supercríticos são capazes de difundir em polímeros, favorecendo a incorporação de substâncias ativas previamente dissolvidas. Desta forma, o carregamento de soluto não está limitado à superfície, mas também é retido dentro da matriz polimérica (GOÑI et al., 2016). O processo de impregnação é viável quando a substância ativa (o soluto) é solúvel no fluido supercrítico, o polímero incha pela solução supercrítica e o coeficiente de partição é suficientemente favorável para permitir que a matriz seja carregada com soluto (KIKIC E VECCHIONE, 2003).

A técnica de impregnação utiliza um solvente não tóxico e inerte, geralmente o CO₂, como solvente para incorporar o aditivo ou o composto ativo na matriz polimérica. O CO₂ é o composto mais comum usado como fluido supercrítico, pois é barato, não tóxico, quimicamente

inerte e pode dissolver uma ampla gama de moléculas orgânicas quando está em condições supercríticas. A região supercrítica do CO₂ é alcançada a pressões e temperaturas moderadas, com uma temperatura crítica (T_c) de 31,06 °C e uma pressão crítica (P_c) de 73,8 bar. Assim, os compostos orgânicos dissolvidos no scCO₂ não são suscetíveis à degradação térmica pelo uso de condições suaves de temperaturas (ROJAS et al., 2015).

Concomitante, permite a preservação de substâncias facilmente degradáveis a altas temperaturas como os óleos essenciais. Além disso, o scCO₂ atua como um solvente transportador e agente de dilatação para a matriz porosa, que são fatores que facilitam a impregnação (COSTA et al., 2010).

A impregnação de alta pressão aproveita a solubilidade e difusividade do CO₂, que são impulsionadas pelo controle de temperatura e pressão. Este fluido solubiliza muitos compostos ativos, especialmente lipofílicos e de baixo peso molecular, devido ao seu bom poder de solvatação intimamente relacionado com sua alta densidade relativa. Além disso, a alta difusividade e baixa viscosidade facilitam a difusão de CO₂ através de várias matrizes de polímero, por inchaço reversível e efeito de plastificação. Um polímero inchado tem um volume livre aumentado que permite uma maior entrada de CO₂ e permite um movimento livre das moléculas ativas entre as cadeias de polímero. Assim, o composto ativo é solubilizado em scCO₂, seguido pela difusão do composto ativo carregado por scCO₂ no interior da matriz do polímero (MEDEIROS; FERREIRA E CARCIOFI, 2017).

Resumidamente, num processo típico de impregnação supercrítica, o polímero (que pode estar na forma de filmes, grânulos, fibras, etc.) é colocado em contato com o scCO₂, ao qual a substância ativa é dissolvida. Em condições de alta pressão, CO₂ é absorvido no polímero, promovendo a plastificação e o inchaço, ocasionando o aumento do volume livre e a difusão da substância ativa na matriz polimérica. Após algum tempo de contato, o sistema é despressurizado, CO₂ é desorvido, o polímero recupera (total ou parcialmente) o seu volume e a sua morfologia original e as moléculas da substância ativa são retidas na matriz polimérica até certo ponto (GOÑI et al., 2016; 2017).

Entre as principais vantagens dessa técnica, pode-se referir que: (I) permite a impregnação em um grande número de diferentes polímeros, de base natural e sintética, promovendo seu inchaço quando em contato com o scCO₂; (II) é particularmente vantajoso impregnar moléculas hidrofóbicas, como óleos essenciais; (III) o carregamento de soluto e a profundidade de impregnação podem ser ajustados mudando as condições do processo; (IV)

origina produtos finais que estão livres de resíduos de solventes orgânicos, pois o scCO_2 é liberado como um gás após a despressurização; e finalmente (V) a técnica permite trabalhar em condições relativamente suaves em um ambiente livre de oxigênio, o que geralmente é desejável quando o objetivo é impregnar compostos naturais com atividade biológica (SOUZA et al., 2014).

A pressão e a temperatura são variáveis que influenciam no processo, pois afetam não só a solubilidade da substância ativa no scCO_2 , mas também a capacidade de sorção do polímero. Vários estudos se concentraram na interação entre o scCO_2 e diferentes polímeros e concluiu-se em termos gerais que o aumento da densidade melhora a absorção do scCO_2 no polímero, consequentemente melhora o carregamento de soluto por plastificação de polímero e o aumento dos coeficientes de difusão interna (CEJUDO BASTANTE et al., 2017).

Na literatura, vários estudos relataram uma ampla gama de pressões e temperaturas usadas para impregnação por CO_2 supercrítico de substâncias ativas em filmes, 100 a 400bar e 25-55°C, respectivamente (ROJAS et al., 2015; MILOVANOVIC et al., 2015; GOÑI et al., 2016; CEJUDO BASTANTE et al., 2017; MEDEIROS; FERREIRA E CARCIOFI, 2017, TORRES et al., 2014). A maioria destes trabalhos são com embalagens plásticas, feitas com polietileno linear de baixa densidade (PELBD).

O tempo de impregnação é estudado em várias faixas que variam de minutos a horas. Entretanto, alguns autores fixaram o tempo de 4 h por assumir que o composto ativo seria impregnado apenas por difusão (GOÑI et al., 2016; 2017; MEDEIROS; FERREIRA E CARCIOFI, 2017).

A despressurização é uma etapa importante também no processo, pois resulta na retenção da substância através de dois mecanismos: impregnação dentro do polímero e dispersão/deposição na superfície (COSTA et al., 2010). Segundo Champeau et al. (2015) a seleção da taxa de despressurização deve estar em concordância com a afinidade da substância ativa e a matriz porosa. Se os materiais tiverem uma forte afinidade, a despressurização lenta é apropriada, enquanto que se eles tiverem baixa afinidade, a substância ativa pode ser facilmente arrastada da matriz pelo scCO_2 e uma alta taxa de despressurização favorece o aprisionamento da substância no polímero.

Para Goñi et al. (2016) quando o sistema é despressurizado a uma taxa elevada, o óleo é arrastado com o CO_2 e se condensa principalmente fora dos filmes (baixo rendimento); e quando a despressurização é lenta, o polímero recupera (parcialmente) sua estrutura anterior e

o grau cristalino e uma maior proporção de óleo é presa no filme quando o limite de solubilidade é atingido (alto rendimento) à temperatura e pressão constante. Logo, a impregnação de polímeros de tipo filme com maior capacidade de inchaço e sorção, a substância ativa se dissolve na matriz polimérica inchada e a carga final será determinada pelo coeficiente de partição dos solutos entre a fase fluida e o polímero e as mudanças de morfologia do polímero que ocorrem durante a despressurização.

O processo é complexo para avaliar e é necessário estudar os influentes fatores principais (pressão e temperatura) previamente relatados para desenvolver um método de impregnação supercrítica para a obtenção de filmes ativos.

7. *Piper divaricatum*

Entre as plantas aromáticas, a família Piperaceae inclui 5 gêneros com aproximadamente 2.000 espécies, caracterizadas como ervas, arbustos e lianas. O gênero *Piper* é o maior desta família e abrange cerca de 700 espécies. Sua ocorrência é relatada em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo, e sua composição química pode variar de acordo com vários fatores devido ao ambiente. Foi extensivamente investigado como a fonte de produtos naturais com potenciais propriedades antifúngicas, antitumorais, antioxidantes, antiplasmodiais e tripanocidas (SILVA et al., 2017).

O gênero *Piper* é o mais representativo da família Piperaceae e muitas de suas espécies apresentam alto rendimento de óleo essencial e excelentes propriedades antifúngicas, antioxidantes e anti-inflamatórias (VILHENA et al., 2019). Os óleos *Piper* oriundos da Amazônia apresentam como constituintes principais terpenóides e fenilpropanóides, sempre com predominância de um sobre o outro (ANDRADE et al., 2011).

P. divaricatum é uma planta aromática encontrada em vários estados do Brasil, principalmente na Mata Atlântica. É conhecida popularmente também como pau-de-angola, jaborandi-manso, "beetle" é um arbusto com até 9 metros de altura. É usado na medicina popular para tratar reumatismo e câibras e também como inseticida. Suas folhas e raízes, quando cozidas, são usadas para banhos antirreumáticos e, em infusão, são empregadas internamente contra dores reumáticas e cólicas (ANDRADE et al., 2009; BARBOSA et al., 2012).

Pesquisas recentes demonstraram seu potencial em doenças neurodegenerativas. Os constituintes piperlonguminina, um conhecido componente amida alcaloide de espécies *Piper*

divaricatum, foi demonstrado como agentes biológicos potentes com interessantes propriedades anticancerígenas que reforçam o potencial anticâncer dos derivados de especiarias (BEZERRA et al, 2008). Além disso, as frações de óleo *P. divaricatum* testadas experimentalmente também mostraram potencial inibitório da acetilcolinesterase, uma enzima alvo importante para a diminuição da progressão da doença de Alzheimer reconhecida como uma doença neurodegenerativa progressiva e a principal causa de demência em adultos (OLIVEIRA et al., 2019).

A espécie vegetal *P. divaricatum* possui uma raiz aromática e um forte sabor semelhante ao gengibre. Seu óleo essencial é rico em metileugenol, um importante composto volátil análogo ao eugenol, sendo comumente relatado como o principal fitoconstituente do óleo essencial de uma variedade de plantas (VILHENA et al., 2019).

Em estudos com espécies coletados na Ilha do Marajó, Pará, Brasil, os principais constituintes encontrados no óleo de *Piper divaricatum* foram metileugenol (75,0%) e eugenol (10,0%), dois fenilpropenos com potente atividade antifúngica (SILVA et al., 2014). Atividade antibacteriana do óleo, obtidos de suas folhas, contra bactérias gram-negativas foram reveladas em estudos de Barbosa et al. (2012).

Além disso, óleos essenciais, como os extraídos de Piperaceae, também demonstraram ser uma fonte importante de antioxidantes naturais e podem ser usados para inibir ou retardar possíveis ações de radicais livres. No trabalho de Corpes et al. (2019) os principais compostos obtidos dos óleos das folhas de *P. divaricatum* foram o metileugenol, E- β -ocimeno e β -elemeno nas culturas *in vivo* e *in vitro* estudadas. E revelou ainda que o conteúdo fenólico determinado exibiu uma boa correlação linear com atividade antioxidante e quantidades de fenilpropanóides.

No entanto, a capacidade antioxidante das frações de óleo essencial de *P. divaricatum* podem não estar totalmente associadas à ação isolada dos fenilpropanóides, mas possivelmente com os efeitos entre os diferentes grupos de compostos bioativos, como monoterpenos, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e outros compostos.

REFERÊNCIAS

- ALPARSLAN, Y.; YAPICI, H. H.; METIN, C.; BAYGAR, T.; GÜNLÜ, A. BAYGAR, T. (2016) Quality assessment of shrimps preserved with orange leaf essential oil incorporated gelatina. **LWT - Food Science and Technology**, 72: 457-466.
- ANDRADE, E. H. A.; GUIMARAES, E. F.; MAIA, J. G. S. **Variabilidade química em óleos essenciais de espécies de Piper da Amazônia** 22.ed. Belém: FEQ/UFPA, 2009. 448p.
- ANDRADE, E. H. A.; ALVES, C. N.; GUIMARÃES, E. F.; CARREIRA, L. M. M.; MAIA, J. G. S. (2011) Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* L. C. Rich. **Biochemical Systematics and Ecology**, 39: 669-675.
- ARFAT, Y. A., AHMED, J., HIREMATH, N., AURAS, R., JOSEPH, A. (2017) Thermo-mechanical, rheological, structural and antimicrobial properties of bionanocomposite films based on fish skin gelatin and silver-copper nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, 62: 191-202.
- ARVANITOYANNIS, I. S. (2002) Formation and properties of collagen and gelatine films and coating. Protein-based films and coating, Aristippos Gennadios (Ed.), Florida, Boca Raton, 275-304.
- ASSIS, O.B.G.; BRITTO, D. (2014) Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações. **Brazilian Journal of Food Technology**, 17(2): 87-97.
- ATARÉS, L.; CHIRALT, A. (2016) Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. **Trends in Food Science and Technology**, 48: 51-62.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. (2008) Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, 46: 446–475.
- BARBOSA, A. J.; SAMPAIO, I.; SILVA, E. M. DA; ALCÂNTARA, J. V. L.; SANTOS, S. (2020) Molecular authentication by DNA barcoding and multiplex PCR assay reveals mislabeling and commercial fraud of the Acoupa weakfish (*Cynoscion acoupa*), an economically important sciaenid marketed in Brazil. **Food Control**, 117: 107351.
- BARBOSA, Q. P. S.; CÂMARA, C. A. G.; RAMOS, C. S.; NASCIMENTO, D. C. O.; LIMA-FILHO, J. V.; GUIMARÃES, E. F. (2012) Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of *Piper divaricatum*: a new source of safrole. **Química Nova**, 35(9):1806-1808.
- BERMÚDEZ-ORIA, A.; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, G.; RUBIO-SENENT, F.;

- FERNÁNDEZ-PRIOR, A.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. (2019) Effect of edible pectin-fish gelatin films containing the olive antioxidants hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol on beef meat during refrigerated storage. **Meat Science**, 148: 213-218.
- BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. D.; ALENCAR, N. M. N.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; et al. (2008) In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from the Piper species. **Journal of Applied Toxicology**, 28: 599–607.
- BONILLA, J.; TALÓN, E.; ATARÉS, L.; VARGAS, M.; CHIRALT, A. (2013) Effect of the incorporation of antioxidants on physicochemical and antioxidant properties of wheat starch–chitosan films. **Journal of Food Engineering**, 118(3): 271-278.
- BORAN, G.; REGENSTEIN, J. M. (2010) Chapter 5 - Fish Gelatin. **Advances in Food and Nutrition Research**, 60: 119-143.
- BOULEDJOUIDJA, A.; MASMOUDI, Y.; SERGENT, M.; BADENS, E. (2017) Effect of operational conditions on the supercritical carbon dioxide impregnation of anti-inflammatory and antibiotic drugs in rigid commercial intraocular lenses. **The Journal of Supercritical Fluids**, 130: 63-75.
- Brasil, Ministério da Pesca e Aquicultura (2010). **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**, Brasil, 2010.
- Brasil, Ministério da Pesca e Aquicultura (2013). **Boletim estatístico de pesca e aquicultura do Brasil 2011**. Brasília: República Federativa do Brasil.
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2016). **Manual de inspeção para identificação de espécies de peixes e valores indicativos de substituições em produtos da pesca e aquicultura**. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA, 188, 2016.
- BUENO, C.M.; ALVIM, I.D.; KOBERSTEIN, T.C.R.D.; PORTELLA, M.C.; GROSSO, C. (2011) Produção de gelatina de pele de tilápia e sua utilização para obtenção de micropartículas contendo óleo de salmão. **Brazilian Journal of Food Technology**, 14(1): 65-73.
- CALVA-ESTRADA, S. J.; JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, M.; LUGO-CERVANTES, E. (2019) Protein-Based Films: Advances in the Development of Biomaterials Applicable to Food Packaging. **Food Engineering Reviews**, 11: 78-92.
- CEJUDO BASTANTE, C.; CASAS CARDOSO, L.; MANTELL SERRANO, C.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E.J. (2017) Supercritical impregnation of food packaging films to provide

antioxidante properties. **The Journal of Supercritical Fluids**, 128: 200–207.

CHAMPEAU, M.; THOMASSIN, J.-M.; TASSAING, T.; JÉRÔME, C. (2015) Drug loading of polymer implants by supercritical CO₂ assisted impregnation: A review. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, 209: 248- 259.

COSTA, V.P.; BRAGA, M.E.M.; GUERRA, J.P.; DUARTE, A.R.C.; DUARTE, C.M.M.; LEITE, E.O.B.; GIL, M.H.; DE SOUSA, H.C. (2010) Development of therapeutic contact lenses using a supercritical solvent impregnation method. **The Journal of Supercritical Fluids**, 52: 306 – 316.

COMMISSION REGULATION EU. (2009). No 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. **Official Journal of the European Union**, 135: 3-11.

COZMUTA, A. M.; TURILA, A.; APJOK, R.; CIOCIAN, A.; COZMUTA, L. M.; PETER, A.; NICULA, C.; GALI, N.; BENKOVI, T. (2015) Preparation and characterization of improved gelatin films incorporating hemp and sage oils. **Food Hydrocolloids**, 49: 144-155.

CORPES, R.; MONTEIRO, L.; ANDRADE, E. H.; MAIA, J. G.; MENEZES, I.; SETZER, W. N.; RAMOSG, A. R.; SILVA, J. K. R. DA. (2019) Comparison of Volatile Profile and Antioxidant Activity of *Piper divaricatum* G. Meyer (Piperaceae) Using Cuttings and Cell Tissue. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 00: 1-8.

DHALL, R. K. (2013) Advances in Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables: A Review, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 53(5): 435-450.

DÍAZ-CALDERON, P.; FLORES, E.; GONZALEZ-MUNOZ, A.; PEPCZYNSKA, M.; QUERO, F.; ENRIONE, J. (2017) Influence of extraction variables on the structure and physical properties of salmon gelatina. **Food Hydrocolloids**, 71: 118-128.

DING, J.; WU, X.; QI, X.; GUO, H.; LIU, A.; WANG, W. (2017) Impact of nano/micron vegetable carbon black on mechanical, barrier and antiphotooxidation properties of fish gelatin film. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 98: 7.

ETXABIDE, A.; URANGA, J.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. (2017) Development of active gelatin films by means of valorisation of food processing waste: A review. **Food Hydrocolloids**, 68: 192-198.

FANOVICH, M.A.; IVANOVIC, J.; MISIC, D.; ALVAREZ, M.V.; JAEGER, P.; ZIZOVIC,

I.; EGGERS. R. (2013) Development of polycaprolactone scaffold with antibacterial activity by an integrated supercritical extraction and impregnation process. **The Journal of Supercritical Fluids**, 78: 42-53.

FAO. (2020). **Situação Mundial da Pesca e Aquicultura 2020**. Sustentabilidade em ação. Roma.: FAO, 2020.

FATHI-ACHACHLOUEI, B.; BABOLANIMOGADAM, N.; ZAHEDI, Y. (2020) Influence of anise (*Pimpinella anisum* L.) essential oil on the microbial, chemical, and sensory properties of chicken fillets wrapped with gelatin film. **Food Science and Technology International**, 27(2): 123–134.

FENG, X.; DAI, H.; MA, L.; FU, Y.; YU, Y.; ZHU, H.; WANG, H.; SUN, Y.; TAN, H.; ZHANG, Y. (2021) Effect of drying methods on the solubility and amphiphilicity of room temperature soluble gelatin extracted by microwave-rapid freezing-thawing coupling. **Food Chemistry**, 351: 129226.

GE, L.; ZHU, M.; LI, X.; XU, Y.; MA, X.; SHI, R.; LI, D.; MU, C. (2018) Development of active rosmarinic acid-gelatin biodegradable films with antioxidant and long-term antibacterial activities. **Food Hydrocolloids**, 83: 308-316.

GOÑI, M. L.; GAÑÁN, N. A.; STRUMIA, M. C.; MARTINI, R. E. (2016) Eugenol-loaded LLDPE films with antioxidant activity by supercritical carbon dioxide impregnation. **The Journal of Supercritical Fluids**, 111: 28–35.

GOÑI, M. L.; GAÑÁN, N. A.; BARBOSA, S.E.; STRUMIA, M. C.; MARTINI, R. E. (2017) Supercritical CO₂-assisted impregnation of LDPE/sepiolite nanocomposite films with insecticidal terpene ketones: Impregnation yield, crystallinity and mechanical properties assessment. **The Journal of Supercritical Fluids**, 130: 337-346,.

GARRIDO, T.; LECETA, I.; CABEZUDO, S.; GUERRERO, P.; CABA, K. DE LA. (2016) Tailoring soy protein film properties by selecting *casting* or compression as processing methods. **European Polymer Journal**, 85: 499–507.

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

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M.A.; MONTERO M. P. (2011) Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a

review. **Food Hydrocoll**, 25(8): 1813–1827.

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

GUERRERO, P.; RETEGI, A.; GABILONDO, N.; DE LA CABA, K. (2010) Mechanical and thermal properties of soy protein films processed by *casting* and compression. **Journal of Food Engineering**, 100: 145–151.

GUILBERT, S.; GONTARD, N.; GORRIS, L.G.M. (1996) Prolongation of shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. **LWT - Food Science and Technology**, 29(1-2): 10-17.

HAUG, J. I.; DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O. (2004) Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. **Food Hydrocolloids**, 18(2): 203-213.

JAHED, E.; KHALEDABAD, M.A.; ALMASI, H.; HASANZADEH, R. (2017) Physicochemical properties of Carum copticum essential oil loaded chitosan films containing organic nanoreinforcements. **Carbohydrate Polymers**, 164: 325-338.

JOLY-DUHAMEL, C.; HELLIO, D.; DJABOUROV, M. (2002) All gelatin networks: 1. Biodiversity and physical chemistry. **Langmuir**, 18(19): 7208-72.

KARIM, A. A.; BHAT, R. (2009) Fish gelatin: properties, challenges and prospects as an alternative to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, 23: 563-576.

KIKIC, I.; VECCHIONE, F. (2003) Current Opinion in Solid State and Materials Science. **Supercritical impregnation of polymers**, 7: 399–405.

KIM, S.K.; MENDIS, E. (2006) Bioactive compounds from marine processing byproducts - A review. **Food Research International**, 39: 383-393.

KIM, H.; BEAK, S. E.; SONG, K. B. (2018) Development of a hagfish skin gelatin film containing cinnamon bark essential oil. **LWT - Food Science and Technology**, 96: 583–588.

KITTIPHATTANABAWON, P.; BENJAKUL, S.; SINTHUSAMRAN, S.; KISHIMURA, H. (2016) Gelatin from clown featherback skin: Extraction conditions. **LWT-Food Science and Technology**, 66: 186-192.

KITTIPHATTANABAWON, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; SHAHIDI, F. (2010) Comparative study on characteristics of gelatin from the skins of brownbanded bamboo

shark and blacktip shark as affected by extraction conditions. **Food Hydrocolloids**, 24(2-3): 164-171.

KJELLOW, A.W.; HENRIKSEN, O. (2009) Supercritical wood impregnation. **The Journal of Supercritical Fluids**, 50: 297-304.

KOŁODZIEJSKA, K.; KACZOROWSKI, B.; PIOTROWSKA; SADOWSKA, M. (2004) Modification of Properties of Gelatin from Skins of Baltic Cod (*Gadus morhua*) with Transglutaminase. **Food Chemistry**, 86: 203–209.

KRISHNA, M.; NINDO, C. I.; MIN, S. C. (2012) Development of fish gelatin edible films using extrusion and compression molding. **Journal of Food Engineering**, 108: 337–344.

LE, T.; MAKI, H.; OKAZAKI, E.; OSAKO, K.; TAKAHASHI, K. (2018) Influence of Various Phenolic Compounds on Properties of Gelatin Film Prepared from Horse Mackerel *Trachurus japonicus* Scales. **Journal of Food Science**, 83: 7.

LEE, J.H.; LEE, J.; SONG, K.B. (2015) Development of a chicken feet protein film containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, 46: 208-215.

LEITE, L. S.F.; FERREIRA, C. M.; CORREA, A. C.; MOREIRA, F. K. V.; MATTOSO, L. H.C. (2020) Scaled-up production of gelatin-cellulose nanocrystal bionanocomposite films by continuous casting. **Carbohydrate Polymers**, 238: 116198.

LESSA, R.; NÓBREGA, M. F. D. Guia de Identificação de Peixes Marinhos da Região Nordeste. Recife, 2000.

LI, M.; ZHANG, F.; LIU, Z.; GUO, X.; WU, Q.; QIAO, L. (2018) Controlled Release System by Active Gelatin Film Incorporated with β -Cyclodextrin-Thymol Inclusion Complexes. **Food and Bioprocess Technology**, 11: 1695–1702.

LI, J. H.; MIAO, J.; WU, J.L.; CHEN, S.F.; ZHANG, Q.Q. (2014) Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. **Food Hydrocolloids**, 37: 166-173.

LIMPISOPHON, K.; TANAKA, M.; OSAKO, K. (2010) Characterisation of gelatin-fatty acid emulsion films based on blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatina. **Food Chemistry**, 122: 1095-1101.

LIN, L.; REGENSTEIN, J. M.; LV, S.; LU, J.; JIANG, S. (2017) An overview of gelatin derived from aquatic animals: Properties and modification-Review. **Trends in Food Science**

& Technology, 68: 102-112.

MARIOD, A. A.; ADAM, H. F. (2013) Revisão: Gelatina, origem, extração e aplicações industriais. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, 12(2): 135-147.

MARTUCCI, J.F.; GENDE, L.B.; GENDE, L.B.; NEIRA, L.M.; RUSECKAITE, R.A. (2015) Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. **Industrial Crops and Products**, 71: 205-213.

MARYAM ADILAH, Z.A; NUR HANANI, Z.A. (2016) Active packaging of fish gelatin films with *Morinda citrifolia* oil. **Food Bioscience**, 16, 66–71.

MEDEIROS, E. F. DE, AFONSO, M. S., SANTOS, M. A. Z. DOS, BENTO, F. M., QUADRO, M. S., ANDREAZZA, R. (2019) Physicochemical characterization of oil extraction from fishing waste for biofuel production. **Renewable Energy**, 143: 471-477.

MILOVANOVIC, S.; HOLLERMANN, G.; ERRENT, C.; PAJNIK, J.; FRERICH, S.; KROLL, S.; REZWAN, K.; IVANOVIC, J. (2018) Supercritical CO₂ impregnation of PLA/PCL films with natural substances for bacterial growth control in food packaging. **Food Research International**, 107: 486-495.

MILOVANOVIC, S.; STAMENIC, M.; MARKOVIC, D.; IVANOVIC, J.; ZIZOVIC, I. (2015). Supercritical impregnation of cellulose acetate with thymol. **Journal of Supercritical Fluids**, 97: 107–115.

MONTERO, P.; BORDERÍAS, J.; TURNAY, J.; LEYZARBE, M.A. (1990) Characterization of hake (*Merluccius merluccius* L.) and trout (*Salmo irideus* Gibb) collagen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 38 (3): 604-609.

MONTERREY-QUINTERO, E.S.; SOBRAL, P.J.A. (2000) Preparo e Caracterização de Proteínas Miofibrilares de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para elaboração de biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35: 179-190.

MOURÃO, K.R.M.; FRÉDOU, F.L.; ESPÍRITO SANTO, R.V.; ALMEIDA, M.C.; DA SILVA, B.B.; FRÉDOU, T.; ISAAC, V. (2009) Sistema de produção pesqueira pescada amarela – *Cynoscion acoupa* Lacèpede (1802): um estudo de caso no litoral nordeste do Pará. **Boletim do Instituto de Pesca**, 35(3): 497 - 511.

MUYONGA, J.H.; COLE, C.G.B.; DUODU, K.G. (2004) Extraction and physicochemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. **Food Hydrocolloids**, 18:

581–592.

NILSUWAN, K.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. (2018) Properties and antioxidative activity of fish gelatin-based film incorporated with epigallocatechin gallate. **Food Hydrocolloids**, 80: 212-221.

NILSUWAN, K.; GUERRERO, P.; CABA, K. DE LA.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. (2021) Fish gelatin films laminated with emulsified gelatin film or poly(lactic) acid film: Properties and their use as bags for storage of fried salmon skin. **Food Hydrocolloids**, 111: 106199.

NITSUWAT, S.; ZHANG, P.; NG, K.; FANG, Z. (2021) Fish gelatin as an alternative to mammalian gelatin for food industry: A meta-analysis. **LWT - Food Science and Technology**, 141: 110899.

NUR HANANI, Z.A.; BEATTY, E.; ROOS, Y.H.; MORRIS, M.A.; KERRY, J.P. (2012) Manufacture and characterization of gelatin films derived from beef, pork and fish sources using twin screw extrusion. **Journal of Food Engineering**, 113: 606–614.

NIU, X.; MA, Q.; LI, S.; WANG, W.; MA, Y.; ZHAO, H.; SUN, J.; WANG, J. (2021) Preparation and Characterization of Biodegradable Composites Films Based on Potato Starch/Glycerol/Gelatin. **Journal of Food Quality**, 2021: 6633711.

OJAGH, S.M.; REZAEI, M.; RAZAVI, S.H.; HOSSEINI, S.M.H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. **Food Chemistry**, 122: 161-166.

OLIVEIRA, M. S. DE; CRUZ, J. N. DA; SILVA, S. G.; COSTA, W. A. DA; SOUSA, S. H. B. DE; BEZERRA, F. W. F.; ET AL. (2019). Phytochemical profile, antioxidant activity, inhibition of acetylcholinesterase and interaction mechanism of the major components of the *Piper divaricatum* essential oil obtained by supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, 145: 74–84.

ROJAS, A.; CERRO, D.; TORRES, A.; GALOTTO, M.J.; GUARDA, A.; ROMERO, J. (2015). Supercritical impregnation and kinetic release of 2-nonanone in LLDPE films used for active food packaging. **The Journal of Supercritical Fluids**, 104, 76-84.

RAO, Y. (2007) Gelatin-clay nanocomposites of improved properties. **Polymer**, 48(18): 5369-5375.

- RASHIDUL ISLAM, M. D.; YUHI, T.; MENG, D.; YOSHIOKA, T.; OGATA, Y.; URA, K.; TAKAGI, Y. (2021) Purity and properties of gelatins extracted from the head tissue of the hybrid kalamtra sturgeon. **LWT - Food Science and Technology**, 142: 110944.
- SADAKA, F.; NGUIMJEU, C.; BRACHAIS, C.H.; VROMAN, I.; TIGHZERT, L.; COUVERCELLE, J.P. (2013) Review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active biomolecules. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 20: 350-355.
- SALLEH, E.; MUHAMMAD, I.I.; PAHLAWI, Q.A. (2014) Spectrum Activity and Lauric Acid Release Behaviour of Antimicrobial Starch based Film. **Procedia Chemistry**, 9: 11-22.
- SANCHEZ-GONZALEZ, L.; VARGAS, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A.; CHÁFER, M. (2011) Use of essential oils in bioactive edible coatings. **Food Engineering Reviews**, 3: 1-16.
- SHANKAR, S.; TENG, X.; LI, G.; RHIM J.W. (2015) Preparação, caracterização e atividade antimicrobiana de filmes nanocompósitos de gelatina / ZnO. **Food Hydrocolloids**, 45: 264-271.
- SHYNI, K.; HEMA, G.S.; NINAN, G.; MATHEW, S.; JOSHY, C.G.; LAKSHMANAN, P.T. (2014) Isolation and characterization of gelatin from the skins of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), dog shark (*Scoliodon sorrakowah*), and rohu (*Labeo rohita*). **Food Hydrocolloids**, 39: 68-76.
- SILVA, E.V.; LOURENÇO, L. F. H.; PENA, R.S. (2017) Optimization and characterization of gelatin from kumakuma (*Brachyplatystoma filamentosum*) skin. **CYTA-Journal of Food**, 15.
- SILVA, J. K. R. DA; ANDRADE, E. H. A.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J. G. S. (2010) Essential Oil Composition, Antioxidant Capacity and Antifungal Activity of *Piper divaricatum*. **NPC Natural Product Communications**, 5(3): 477-480.
- SILVA, J. K. R. DA, SILVA, J. R. A., NASCIMENTO, S. B., LUZ, S. F. M. DA, MEIRELES, E. N., ALVES, C. N., RAMOS, A. R., MAIA, J. G. S. (2014) Antifungal Activity and Computational Study of Constituents from *Piper divaricatum* Essential Oil against *Fusarium* Infection in Black Pepper. **Molecules**, 19: 17926-17942.
- SILVA, N. DA S.; FARIAS, F. S.; FREITAS, M. M. DOS S.; HERNÁNDEZ, E. J. G. P.; DANTAS, V. V.; OLIVEIRA, M. E. C.; JOELE, M. R. S. P.; LOURENÇO, L. F. H. (2021) Artificial intelligence application for classification and selection of fish gelatin packaging film

produced with incorporation of palm oil and plant essential oils. **Food Packaging and Shelf Life**, 27: 100611.

SILVA, N. DA S.; HERNÁNDEZ, E. J. G. P.; ARAÚJO, C. D. S. A.; JOELE, M. R. S. P.; LOURENÇO, L. D. F. H. (2018) Development and optimization of biodegradable fish gelatin composite film added with buriti oil. **CyTA - Journal of Food**, 16(1): 340-349.

SILVA, S. G.; BICHARA JUNIOR, T. W.; ANDRADE, E. H. A.; SANTOS, L. S.; MAIA, J. G. S.; NASCIMENTO, L. D.; PINHEIRO, R. O.; CARDOSO, J. L. V.; DIAS, S. L. C. (2017) Constituintes voláteis de *Lippia thymoides* mart. & schauer (verbenaceae) obtidos das folhas/ramos por hidrodestilação (hd) e destilação e extração simultânea (des). **54° CBQ- Congresso Brasileiro de Química**, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (2007). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre:UFRGS, 1104P.

SHAHBAZI, Y. (2017) The properties of chitosan and gelatin films incorporated with ethanolic red grape seed extract and Ziziphora clinopodioides essential oil as biodegradable materials for active food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, 99: 746–753.

SHIMIZU, T.; USHIKI, I.; OTA, M.; SATO, Y.; KOIZUMI, N.; INOMATA, H. (2015) Preparation of mesoporous silica supported cobaltcatalysts using supercritical fluids for Fischer–Tropsch synthesis. **Chemical Engineering Research and Design**, 9(5): 64–68.

SOUZA, A. C. DE; DIAS, A. M. A.; SOUSA, H. C.; TADINI, C. C. (2014) Impregnation of cinnamaldehyde into cassava starch biocomposite films using supercritical fluid technology for the development of food active packaging. **Carbohydrate Polymers**, 102: 830–837.

SOUZA, A. F. DE; INHAUMUNS, A. J. (2011) Análise de rendimento cárneo das principais espécies comercializadas no estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, 41(2): 289-296.

SUPPAKUL, P.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S.W.; MILTZ, J. (2008) Efficacy of polyethylene-based antimicrobial films containing principal constituents of basil. **LWT - Food Science and Technology**, 41: 779–788.

SZPILMAN, M. (2000). *Peixes Marinhos do Brasil: Guia prático de identificação*. Rio de Janeiro: Mauad.

TEMIZ, N. N.; ÖZDEMİR, K. S. (2021) Microbiological and physicochemical quality of

strawberries (*Fragaria × ananassa*) coated with *Lactobacillus rhamnosus* and inulin enriched gelatin films. **Postharvest Biology and Technology**, 173: 111433.

THEERAWITAYAART, W.; PRODPRAN, T.; BENJAKUL, S. (2019) Properties of films from fish gelatin prepared by molecular modification and direct addition of oxidized linoleic acid. **Food Hydrocolloids**, 88: 291–300.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. (2016) Mechanical, thermal and heat sealing properties of fish skin gelatin film containing palm oil and basil essential oil with different surfactants. **Food Hydrocolloids**, 56: 93–107.

TORRES, A.; ROMERO, J.; MACAN, A.; GUARDA, A.; GALOTTO, M.J. (2014) Near critical and supercritical impregnation and kinetic release of thymol in LLDPE films used for food packaging. **The Journal of Supercritical Fluids**, 85: 41–48.

URANGA, J.; ETXABIDE, A.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. (2018) Development of active fish gelatin films with anthocyanins by compression Molding. **Food Hydrocolloids**, 84: 313–320.

URANGA, J.; PUERTAS, A. I.; ETXABIDE, A.; DUEÑAS, M. T.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. (2019) Citric acid-incorporated fish gelatin/chitosan composite films. **Food Hydrocolloids**, 86: 95-103.

UMARAW, P.; MUNEKATA, P. E.S.; VERMA A. K.; BARBA, F. J.; SINGH, V.P.; KUMAR, P.; LORENZO, J. M. (2020) Edible films/coating with tailored properties for active packaging of meat, fish and derived products. *Trends in Food Science & Technology*, 98: 10-24.

VALE, D. A. D.; Vieira, C. B.; Oliveria, J. M. D.; Vidal, M. F.; Alcântara, L. O. D.; Silva, A. I. M. D.; et al. (2020) Determining the wetting capacity of the chitosan coatings from *Ucides cordatus* and evaluating the shelf-life quality of *Scomberomorus brasiliensis* fillets. **Food Control**, 116: 107329.

VILHENA, C. S.; NASCIMENTO, L. A. S. DO; ANDRADE, E. H. DE A.; SILVA, J. K. R. DA; HAMOY, M.; TORRES, M. F.; BARBAS, L. A. L. (2019) Essential oil of *Piper divaricatum* induces a general anaesthesia-like state and loss of skeletal muscle tonus in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, 510: 169–175.

WU, J.; SUN, X.; GUO, X.; GE, S.; ZHANG, Q. (2017) Physicochemical properties, antimicrobial activity and oil release of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil. **Aquaculture and Fisheries**, 2(4): 185-192.

ZAVAREZE, E.R.; HALAL, S.L.M.; TELLES, A.C.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. (2012)
Biodegradable films based on myofibrillar proteins of fish. **Brazilian Journal of Food Technology**, IV SSA: 53-57.

CAPÍTULO II: Impregnação de CO₂ supercrítico do óleo essencial *Piper divaricatum* em filme de gelatina de pele de peixe (*Cynoscion acoupa*)¹

Resumo

Filmes com propriedades antioxidantes usando gelatina de pele de peixe de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) foram obtidos após impregnação por solvente supercrítico do óleo essencial *Piper divaricatum*, para produção de embalagem ativa para alimentos. O processo de impregnação foi realizado usando o CO₂ como solvente supercrítico, em autoclave a 35 °C, nas pressões de 100, 150 e 200 bar e tempos de 60, 90 e 120 min. O filme que apresentou maior percentual de atividade antioxidante foi obtido a 100 bar e 60 min (41,63 ± 1,6%). A microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou que o óleo essencial apresentou distribuição heterogênea no filme, confirmando a sua impregnação. A análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) mostrou que as propriedades estruturais do filme sofreram alteração após o processo, no qual a interação do óleo essencial com as proteínas do filme foi confirmada. A impregnação resultou em um filme com menor resistência à tração, maior flexibilidade e maior opacidade quando comparado ao filme controle. A análise termogravimétrica indicou que a estabilidade térmica diminuiu após o processo de impregnação. Os filmes obtidos apresentaram características que sugerem seu potencial como embalagem ativa para produtos alimentícios.

Palavras-chaves: Impregnação por solvente supercrítico; Filme ativo; *Cynoscion acoupa*; *Piper divaricatum*; Dióxido de carbono.

1 INTRODUÇÃO

As embalagens biodegradáveis representam uma alternativa para minimizar o impacto ambiental causado por polímeros convencionais, derivados de petróleo. Entre os biopolímeros utilizados, a gelatina de origem marinha, especialmente a derivada de pele de peixes, tem sido apontada como material promissor para a elaboração de filmes biodegradáveis, pois apresenta

¹ Artigo publicado em Food and Bioprocess Technology, DOI 10.1007/s11947-020-02514-w.

propriedades filmogênicas importantes, valor nutritivo e baixo custo (AZEREDO, 2009; MARTUCCI et al., 2015).

Cynoscion acoupa (Lacepède, 1802) é uma espécie marinha da Família Sciaenidae, amplamente distribuída no oeste do Sul Atlântico, entre o Panamá e a Argentina (CERVIGÓN et al., 1993). No Brasil, esta espécie é um dos mais importantes recursos pesqueiros, desde 2000-2011, 264.419,70 toneladas foram comercializadas, sendo mais de 90% dessa produção foi desembarcado no litoral norte do Brasil. Além disso, o estado do Pará, entre 2000 e 2007, produziu 141.336 toneladas (IBAMA 2000–2007; MPA 2010, 2012). Além disso, a pele é responsável por um intenso acúmulo de resíduo da filetagem, o que a torna uma fonte viável para a produção de gelatina (SILVA et al., 2018). Isso é devido à hidrólise parcial ou degradação térmica do colágeno, que é o principal tecido conjuntivo da proteína (HOQUE et al., 2011). Além de ser uma alternativa à gelatina de mamíferos por razões socioculturais (NUR HANANI et al., 2012), a gelatina de peixe agrega valor significativo a indústria de processamento de pescado e minimiza o impacto ambiental gerado por seus resíduos.

Existem vários estudos que destacam o desenvolvimento de filmes à base de gelatina usando óleos essenciais ou extratos vegetais, que apresentam ação antioxidante e/ou antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2018). Esses produtos visam prolongar a vida útil dos alimentos, reduzindo as populações microbianas da superfície, retardando a oxidação lipídica e reduzindo o uso de materiais sintéticos (ADILAH E HANANI, 2016; SHAHBAZI 2017; WU et al., 2017). Entre os compostos naturais, os óleos essenciais têm sido amplamente utilizados para a conservação de alimentos devido ao suas propriedades antioxidantes, antibacterianas e antifúngicas. Os óleos extraídos de Piperaceae demonstraram ser uma fonte importante de antioxidantes naturais e podem ser usados para inibir ou retardar possíveis ações de radicais livres (REDDY et al., 2014). Eles apresentam duas classes de metabólitos secundários, terpenóides e fenilpropanóides, que mostraram ter propriedades antioxidantes (OLIVEIRA et al., 2019).

Em geral, os filmes de gelatina com óleo essencial (OE) são formados pela técnica de *casting*, com incorporação do óleo na solução formadora de filme por emulsificação ou homogeneização, com adição de emulsificantes ou surfactantes (TONGNUANCHAN et al., 2014). Entretanto, após a secagem, gotículas lipídicas colapsadas permanecem incorporadas na matriz polimérica, formando poros e, conseqüentemente, ocorrendo a separação dos agentes antioxidantes da fase aquosa (CHIRALT E ATAR, 2016), o que pode levar a baixos rendimentos de inclusão do ativo e mudanças nas propriedades físicas dos filmes (YE et al.,

2017; LI et al., 2018). Assim, os filmes formados apresentam algumas desvantagens, principalmente devido ao caráter hidrofóbico do óleo, o que dificulta sua aplicação direta na solução de gelatina para obtenção de um material homogêneo (LI et al., 2014; COZMUTA et al., 2015; CHIRALT E ATAR, 2016).

Os métodos mais usados para incorporar substâncias ativas em filmes poliméricos são extrusão a quente, revestimento e moldagem por solvente (MIR et al., 2017), porém, estes métodos apresentam algumas limitações. Em geral, os óleos são sensíveis ao calor, o que pode afetar seu potencial ativo, e a extrusão a quente requer altas temperaturas (80 a 130 °C). Solano e Gante (2012) ao elaborar filme de polietileno de baixa densidade (PEBD) com óleos essenciais de orégano e tomilho usaram temperatura acima de 180 °C. Burgos et al. (2017) também usaram altas temperaturas em filmes de poli(ácido láctico) e polihidroxibutirato com carvacol.

Orsuwan e Sothornvit (2018) usaram emulsificante, tween 80, para ajudar na incorporação de óleo essencial de alho em filmes ativos de nanocompósitos de farinha de banana. Samsalee e Sothornvit (2020) ao elaborar filme a base de proteínas plasmáticas de suínos usaram Span 20 para encapsular óleo de açafrão e observaram poros e rachaduras nas superfícies e nas seções transversais dos filmes, que podem ter sido causados pela evaporação do óleo essencial durante a secagem. Li et al. (2018) fez uso de β -Cyclodextrina para aumentar a solubilidade de óleo de timol em filmes de gelatina; no entanto, a adição de partículas extras na matriz do filme causou mudanças indesejáveis na estrutura do filme, com a adição do complexo aumentou a interação do grupo hidroxila com a água, diminuindo o rendimento do ativo e causando mudanças nas propriedades físicas dos filmes.

A técnica de impregnação com solvente supercrítico (ISS) surge como uma tecnologia alternativa e promissora para o desenvolvimento de filmes ativos (SOUZA et al., 2014; TORRES et al., 2014 ; CEJUDO BASTANTE et al., 2017; MEDEIROS et al., 2017; MIR et al., 2017) Este método é baseado no uso de um agente supercrítico, como CO₂ ou CO₂ + co-solvente, que atua como um veículo de transporte para o agente a ser impregnado, e também plastifica a matriz polimérica, aumentando o volume livre e facilitando a difusão do agente (COSTA et al., 2010). O CO₂ é comumente usado como um fluido supercrítico devido ao seu ponto crítico moderado (31,06 °C e 73,8 bar), alta difusividade, baixa viscosidade, não toxicidade e é também considerado “ambientalmente amigável”, entre outros fatores (MILOVANOVIC et al., 2015).

Entre as principais vantagens da técnica ISS, pode ser mencionado que (i) permite a impregnação de diversos polímeros naturais ou sintéticos quando em contato com dióxido de carbono supercrítico (scCO₂); (ii) é particularmente vantajoso impregnar moléculas hidrofóbicas, como óleos essenciais; (iii) o carregamento de soluto e a profundidade da impregnação podem ser ajustados alterando as condições de operação, como pressão, tempo, temperatura e taxa de despressurização; (iv) origina produtos finais livres de resíduos de solventes, conforme o scCO₂ é liberado como um gás à temperatura ambiente após a despressurização; e finalmente (v) a técnica permite trabalhar em condições relativamente suaves em um ambiente livre de oxigênio, o que geralmente é desejável quando o objetivo é impregnar compostos naturais que apresentam atividade biológica (SOUZA et al., 2014).

Filmes com vários polímeros e substâncias ativas foram preparados por ISS, como polietileno tereftalato/polipropileno (PET/PP) com extrato de folha de oliveira (CEJUDO BASTANTE et al., 2017, 2019); polietileno linear de baixa densidade (PELBD) com eugenol (GOÑI et al., 2016) e óleo essencial de cravo (MEDEIROS et al., 2017); amido de mandioca puro com cinamaldeído (SOUZA et al., 2014); e polietileno de baixa densidade (PEBD)/sepiolite e cetonas (GOÑI et al., 2017). No entanto, não há relatos na literatura sobre o uso desta técnica em filmes de gelatina.

Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo desenvolver uma embalagem ativa para alimentos a partir de gelatina da pele de peixe de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) e óleo essencial *Piper divaricatum* impregnado pela técnica de ISS.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATÉRIA-PRIMA

A pele de *Cynoscion acoupa* foi doada pela Costa Norte Comércio de Pescado Ltda (Icoaraci, Brasil). As espécies foram capturadas em julho de 2018, através de pesca extrativista realizada na Zona FAO 41.1.1 (Amazônia, Norte, Brasil), com comprimento variando de 57 a 126 cm. A pele foi obtida após a remoção do filé e em seguida congelada. As folhas de *Piper divaricatum* utilizadas para a extração do óleo foram coletados em Belém (Pará, Brasil) no primeiro semestre de 2017, foram identificadas por comparação com uma amostra autêntica, e sua exsiccata foi incorporada, sob número de registro MG-165214, no Herbário do Museu Emilio Goeldi (Belém, Brasil).

2.2 EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper divaricatum*

A extração do óleo foi realizada por CO₂ supercrítico sob condições experimentais de 35 °C e 300 bar, em um Sistema Spe-ed SFE (modelo 7071, Separações Aplicadas, Allentown, PA, EUA), acoplado a um compressor (modelo CSA 7.8, Schulz S / A, Joinville, Brasil), um tanque de CO₂ (99,9% de pureza, White Martins, Belém, Brasil), um recirculador (modelo F08400796, Polyscience, Illinois, EUA) e um medidor de vazão de CO₂ (modelo M 5SLPM, sistema Alicat Scientific, Tucson, EUA).

2.3 EXTRAÇÃO DA GELATINA

A gelatina de pele de pescada amarela foi obtida de acordo com a metodologia descrita por Silva et al. (2018), com modificações no processo de secagem em estufa, sendo utilizada temperatura de 50 °C, durante 16 h. Posteriormente, a gelatina foi embalada a vácuo e armazenada a -18 °C.

2.4 ELABORAÇÃO DE FILME DE GELATINA

Os filmes foram preparados de acordo com a metodologia apresentada por Gómez-Estaca et al. (2009), com mudanças nas proporções de gelatina e glicerol e na secagem dos filmes. A gelatina foi dissolvida em água destilada (3% p/v) e foi adicionado glicerol (20% p/p de proteína) para obter a solução filmogênica (SF). A SF foi agitada e aquecida a 60 °C por 30 min, em seguida, distribuída em bandejas circulares de silicone e seca em estufa a 35 °C por 18 h. Após a secagem, os filmes obtidos foram armazenados a vácuo em sacos de plástico e mantidos sob refrigeração.

2.5 IMPREGNAÇÃO COM SOLVENTE SUPERCRÍTICO (ISS) DE ÓLEO ESSENCIAL EM FILME DE GELATINA

A ISS do OE nos filmes de gelatina foi realizada em autoclave de aço inoxidável (modelo 2777 1000, Top Industrie, França) com volume interno de 0,095 L (0,128 x 0,152 m) e com capacidade operacional máxima de 300 bar e 350 °C. Para a autoclave foram acoplados: colar de aquecimento (modelo 2777 1021, Top Industrie, França), agitador magnético (modelo

616 0100, Top Industrie, França), termopar (modelo TKA 15 x 20 HMP, Erciat, França), cabeçote de segurança (modelo 728 0350, Top Industrie, França), disco de ruptura (modelo 728 0400, Sitec, Suíça), transdutor de pressão (modelo PA-23SY, Keller, Suíça), painel de controle (modelo TS1070, MonitouchTechnoshot, Holanda), bomba de líquido, compressor de ar (modelo CSA, Schulz S/A, Brasil), cilindro com CO₂ (99,9 % de pureza, White Martins, Brasil) e recirculador (modelo F08400796, Polyscience, EUA), conforme ilustrado na Fig. 1.

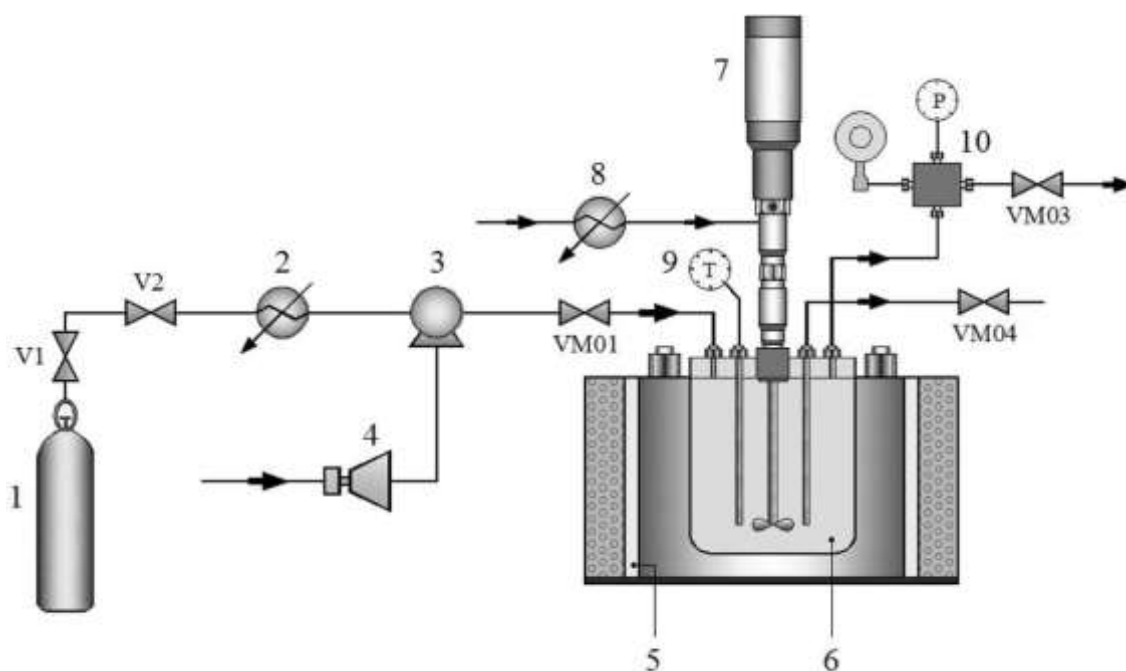


Figura 1. Representação esquemática do sistema ISS. (1) tanque de CO₂; (2) banho de resfriamento; (3) bomba; (4) compressor; (5) colar de aquecimento; (6) autoclave; (7) agitador magnético; (8) banho de resfriamento; (9) termopar; (10) cabeça de segurança e disco de ruptura; V1-V2 / VM01-VM04 válvulas de controle de fluxo (adaptadas de BEZERRA et al., 2018).

Para o processo de ISS, as amostras dos filmes foram cortadas no comprimento e largura máximos (12,5 cm x 3 cm), considerando as dimensões da autoclave, e então pesadas e mantidas com massa de $0,5 \pm 0,04$ g, para manter a semelhança das amostras. Posteriormente, elas foram fixadas em um suporte de aço inoxidável em posição vertical para evitar a movimentação durante as etapas de pressurização e despressurização e inseridas na autoclave. Logo abaixo do filme, 40 µg de OE foram depositados. Após o fechamento do sistema, temperatura e rotação do agitador (40 rpm) foram definidos no painel de controle e o CO₂ foi liberado até atingir a pressão desejada.

As corridas de ISS foram realizadas em duplicata, com pressões de 100, 150 e 200 bar e tempos de 60, 90 e 120 min. Em todos os ensaios, o processo foi realizado à 35 °C e taxa de despressurização de 10 bar.min⁻¹. A densidade do CO₂ foi calculada usando o software desenvolvido pelo National Institute of Standards and Technology (NIST), que aplica a equação de estado desenvolvida por Span e Wagner (1996). Esses parâmetros foram selecionados com base em experimentos e trabalhos anteriores (GOÑI et al., 2016, 2017; MEDEIROS et al., 2017).

Após a despressurização, os filmes foram removidos da autoclave e embalados a vácuo, protegidos da luz, e armazenados sob refrigeração a 8 °C até as análises de caracterização. Depois de determinar a melhor condição operacional, uma amostra controle foi realizada com um filme de gelatina sem óleo (FG-CO₂) para avaliar possíveis mudanças após ser submetido apenas ao CO₂ supercrítico. Pequenas diferenças de peso antes e depois do processo de impregnação tornaram necessário o uso da reação DPPH como um método indireto para calcular a massa de antioxidante impregnado.

2.6 ANÁLISES DOS FILMES

O filme de gelatina controle (FG-Controle), filme de gelatina pressurizado (FG-CO₂) e filme impregnado com óleo (FG-Óleo) foram avaliados através das análises descritas a seguir.

2.6.1 Atividade antioxidante do óleo essencial e dos filmes

O percentual de inibição de atividade antioxidante (IAA%) foi realizado em todas as amostras submetidas a ISS. Esta análise foi realizada conforme procedimento descrito por Cejudo Bastante et al. (2017). 100 mg de filme foram mantidos em contato com 3,9 mL de uma solução de DPPH (6x10⁻⁵ mol.L⁻¹), durante 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O metanol foi usado como controle. Após este período, as amostras foram lidas a 515 nm utilizando um espectrofotômetro UV-vis (Thermo Scientific, Evolution 60). Para avaliar o óleo, este foi diluído em metanol a 500 mg.L⁻¹ e o mesmo procedimento do filme foi realizado. Os ensaios foram realizados em duplicata e o percentual de inibição de atividade antioxidante (IAA %) foi calculado utilizando a Eq. 1:

$$IAA \% = \frac{A_f - A_o}{A_o} \times 100 \quad (1)$$

Onde: A_o é a absorvância do controle e A_f é a absorvância da amostra

2.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para realizar a análise por microscopia eletrônica de varredura (Tescan, Vega 3 LMU, Dortmund, Alemanha), as amostras foram revestidas de ouro com auxílio de metalizadora (Quorum Technologies, SC7620, Inglaterra, Reino Unido) para permitir a condutividade elétrica necessária à formação das imagens. Então, elas foram observadas usando uma tensão de aceleração de 10 KV.

2.6.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram analisadas por espectrômetro de infravermelho com transformador de Fourier (Bruker Co., Ettlingen, Alemanha), em uma faixa espectral variando de 400 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

2.6.4 Propriedades mecânicas e espessura

A resistência à tração e a ruptura no alongamento foram medidas em máquina de teste universal (Instron, EUA). Amostras retangulares (50 × 10 mm) foram usadas em todas os ensaios, com uma separação inicial de aperto de 30 mm. Os testes foram conduzidos sob uma velocidade de cruzamento constante de 30 $\text{mm} \cdot \text{min}^{-1}$ até a ruptura. A resistência à tração e % de alongação foram registrados ao longo de cada teste. A espessura dos filmes foi medida aleatoriamente em torno do filme antes de todos os testes com resolução de 0,001 mm com um micrômetro digital (Insize, IP54, Brasil). Todos os testes foram replicados oito vezes.

2.6.5 Cor, transmissão de luz e transparência de filmes

A cor dos filmes foi determinada em colorímetro (CR-400 / KONICA MINOLTA, Tóquio, Japão), usando o sistema CIElab: onde L^* (luminosidade), a^* (verde ao vermelho), b^* (azul ao amarelo) e a diferença total de cor (ΔE^*) foi calculada de acordo com a Eq. 2.

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

Onde: ΔL^* , Δa^* e Δb^* são diferenças entre os parâmetros das amostras e controle.

A transmitância de luz no ultravioleta (UV) e na gama visível das amostras dos filmes foi medida em comprimentos de onda selecionados entre 200 e 800 nm usando um espectrofotômetro UV-vis (Thermo Scientific, Evolution 60, Waltham, EUA). O valor de transparência do filme foi calculado usando a seguinte Eq. 3:

$$T = \frac{A_{600}}{x} \quad (3)$$

Onde: T é a transmissão fracionária a 600 nm e x é a espessura do filme (mm).

2.6.6 Análise termogravimétrica (ATG)

Os filmes acondicionados em cadinhos de alumínio foram varridos de 20 à 600 °C, a uma taxa de 10 °C.min⁻¹ utilizando um analisador termogravimétrico (DTG-60H, Shimadzu, USA), sob atmosfera de nitrogênio a uma vazão de 50 mL.min⁻¹.

2.6.7 Análise estatística

Os dados experimentais foram analisados por análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95%, usando o software Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., Oklahoma, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS FILMES DE GELATINA COM ÓLEO ESSENCIAL

A reação do DPPH foi usada para avaliar o potencial antioxidante do óleo essencial impregnado no filme de gelatina por CO₂ supercrítico. Os resultados da atividade antioxidante (IAA%) dos filmes, em cada condição de impregnação, são apresentados na Tabela 1. Esta análise também foi realizada no óleo puro (47,58 ± 2,8%), FG-Controle (12,88 ± 0,2%) e FG-CO₂ (11,03 ± 2,0 %). A partir da Tabela 1, pode-se inferir que o IAA% de todos os filmes, sob condições de pressão e tempo analisados, foram superiores às amostras FG-Controle e FG-CO₂, constatando que o OE melhorou a atividade antioxidante dos filmes de gelatina impregnados por ISS. Este aumento significativo na atividade antioxidante presente no filme impregnado é

devido aos metabólitos secundários presentes no óleo, que pode prevenir a oxidação de lipídios causada por radicais livres, prolongando a vida útil dos alimentos (DENG et al., 2020).

Tabela 1. Atividade antioxidante dos filmes de gelatina impregnados com óleo essencial *Piper divaricatum*.

Pressão (bar)	Densidade do CO ₂ (Kg.m ⁻³)	Tempo (min)	IAA (%)
100	712,81	60	41,63 ± 1,6 ^a
		90	23,56 ± 0,7 ^b
		120	19,57 ± 1,2 ^{c,d,e}
150	815,06	60	22,53 ± 2,0 ^{b,c}
		90	22,04 ± 1,0 ^{b,c,d}
		120	21,54 ± 0,4 ^{b,c,d}
200	865,72	60	20,73 ± 1,0 ^{b,c,d}
		90	18,75 ± 1,8 ^{d,e}
		120	16,88 ± 1,0 ^e

* Média ± DP (n=3). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores (p≤0,05). AAI%: Inibição de atividade antioxidante.

Observa-se que a condição de menor pressão (100 bar), menor densidade de CO₂ (712,81 kg.m⁻³) e menor tempo de impregnação (60 min) apresentou a maior atividade antioxidante (41,63± 1,6%). Estudos que usaram outras metodologias também encontraram melhora na atividade antioxidante dos filmes com adição de óleos (ALPARSLAN E BAYGAR, 2017; BURGOS et al., 2017; WANG et al., 2017). Wu et al. (2018), ao elaborar filmes de gelatina de peixe incorporados com β-ciclodextrina/curcumina, observaram que o aumento na porcentagem de curcumina proporcionou uma melhora na capacidade antioxidante. Esta propriedade, na maioria dos extratos de plantas, foi atribuída à capacidade de quebrar a cadeia de radicais livres através da doação de um átomo de hidrogênio (WANG et al., 2017).

Também pode ser observado que o aumento da pressão e do tempo de exposição ao CO₂ resultou em uma diminuição da atividade antioxidante nos filmes, devido ao arraste do OE ainda interagindo com CO₂, durante a fase de despressurização (ROJAS et al., 2015). Este comportamento pode ser atribuído a afinidade da substância ativa (OE) com CO₂ supercrítico, ambos de caráter apolar, que se destacou sobre a afinidade do OE com o filme (constituído de gelatina e glicerol, ambos de caráter polar). Foi relatado que compostos hidrofóbicos têm mais afinidade com polímeros que possuem alquil de longas cadeias, que conferem maior hidrofobicidade. Assim, pode ser necessário considerar não apenas a polaridade, mas também o tamanho dos compostos. O alto peso molecular de um composto pode impedir sua difusão e, assim, sua impregnação no polímero (CEJUDO BASTANTE et al., 2018).

Ao analisar a variação do tempo em 100 bar, pode-se observar que o IAA% diminuiu ao longo do processo de impregnação, mostrando uma diferença estatística significativa

($p \leq 0,05$) em 60, 90 e 120 min. No entanto, em outras pressões, não houve diminuição significativa no IAA% ($p > 0,05$). Nos estudos com extrato de azeitona em filmes PET/PP, não foi necessário estender o processo de impregnação por várias horas para comprovar a sua eficiência, visto que a impregnação ocorreu no momento que a substância ativa foi dissolvida (CEJUDO BASTANTE et al., 2017). Outro estudo também observou que a atividade antioxidante máxima foi obtida após 60 min de impregnação (CEJUDO BASTANTE et al., 2018).

Comportamento semelhante foi relatado no estudo de impregnação de 2-nonanona em filmes LLDPE (ROJAS et al., 2015) e de extrato de folha de manga em poliéster (CASAS et al., 2017), em que os valores de menor pressão resultaram em impregnações mais eficientes. No entanto, alguns estudos têm apontado que as interações soluto-polímero prevaleceram sobre a interação CO_2 /soluto com o aumento da pressão, a 35 °C (CEJUDO BASTANTE et al., 2019; TORRES et al., 2014). Cejudo Bastante et al. (2019) relatou que, em filmes PET/PP, as amostras impregnadas a 400 bar tiveram maiores cargas do que as impregnadas a 100 bar devido ao aumento densidade de CO_2 e plastificação induzida.

Assim, a impregnação de fluido supercrítico de um aditivo em um polímero depende fortemente das interações intermoleculares do sistema ternário de polímero-aditivo- CO_2 , o que significa que eles estão intimamente ligados às características de transferência de massa e comportamento da fase das misturas de polímero- CO_2 , polímero-aditivo e aditivo- CO_2 (SHEN et al., 2008). Na impregnação de polímeros de tipo filme, com maior capacidade de inchaço e sorção, a substância ativa é dissolvida na matriz polimérica inchada. A carga final é determinada pelo coeficiente de partição dos solutos e as mudanças de morfologia que ocorrem durante a despressurização (COSTA et al., 2010).

3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Na microscopia eletrônica de varredura foi possível observar que o FG-Controle (Fig. 2a) apresentou superfície lisa e contínua, devido à presença de uma estrutura de rede ordenada e homogênea. Enquanto que o FG- CO_2 (Fig. 2b) apresentou rugosidade na superfície devido ao rompimento de interações proteína-proteína na matriz do filme e inchaço ocasionado pela passagem do CO_2 . No entanto, o dano físico não foi observado nas amostras a olho nu.

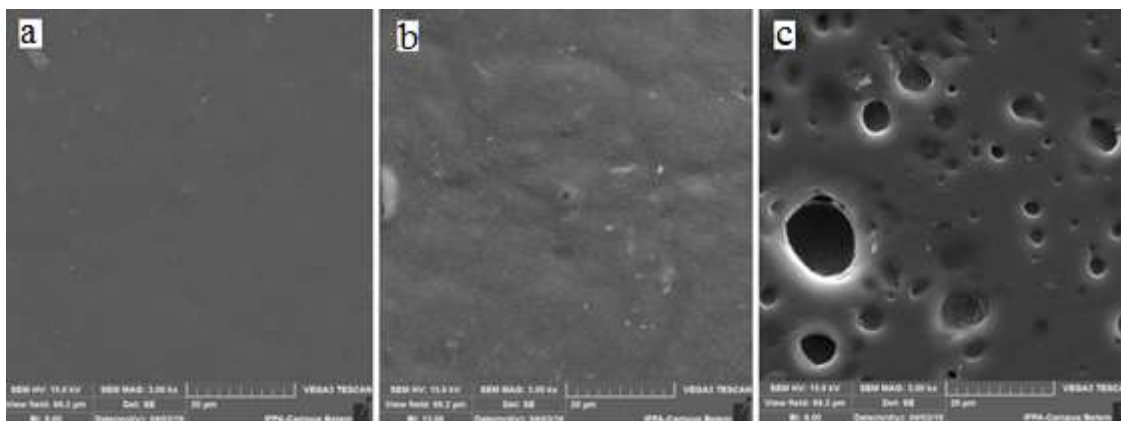


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de gelatina: a) FG-Controle, b) FG-CO₂ e c) FG-Óleo (100 bar/60 min).

A imagem do FG-Óleo (Fig. 2c) evidenciou gotículas de OE na sua estrutura, confirmando sua presença no filme impregnado, com distribuição heterogênea desses compostos. O que pode ser devido à agregação de pequenas gotas ou pelo encapsulamento do OE no filme durante a impregnação, pois, durante este processo, o substrato é física ou quimicamente adsorvido no polímero. Isso significa que pode haver um aprisionamento físico do agente ativo na rede do polímero quando o CO₂ é removido ou uma ligação físico-química do composto direcionado aos sítios ativos da matriz polimérica (DÍEZ- MUNICIO et al., 2011; VARONA et al., 2011; WEIDNER, 2018).

Trabalhos anteriores com filmes de gelatina elaborados por fundição, que usaram emulsificantes para auxiliar a incorporação do complexo Trans- Anetol/ β -Ciclodextrina (YE et al., 2017), óleo de citronela e manjeriço (TONGNUANCHAN et al., 2014) relataram morfologia mais heterogênea com o aumento do conteúdo do composto ativo. Essa descontinuidade foi também observada em diferentes matrizes de filmes poliméricos incorporados com óleos (BOF et al., 2016; ORSUWAN E SOTHORNVIT, 2018; SAMSALEE E SOTHORNVIT, 2020). As principais vantagens do uso de CO₂ supercrítico são a possibilidade de operar sob temperaturas amenas e, assim, ser capaz de incorporar componentes termossensíveis, além de obtenção de filmes ativos livres de solvente após sua evaporação com a despressurização do sistema (MIR et al., 2017).

Assim, a partir das micrografias obtidas, é possível comprovar a impregnação do OE, através da técnica ISS, em filmes de gelatina de pele de *Cynoscion acoupa*. Também pode ser inferido que o CO₂ e o OE mudaram a estrutura morfológica dos filmes.

3.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os espectros de FTIR dos filmes de FG-Controle, FG-CO₂ e FG-Óleo apresentaram semelhança nos principais picos característicos da gelatina, porém variaram levemente quanto em amplitudes, de acordo com a pressão usada na presença (FG-Óleo) ou ausência de OE (FG-Controle e FG-CO₂) (Fig. 3).

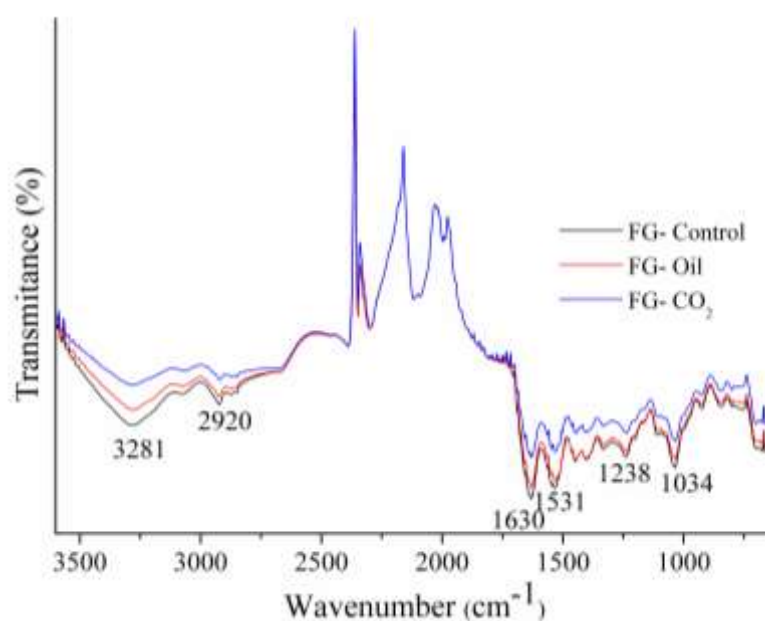


Figura 3. Espectros de FTIR dos filmes FG-Controle, FG-CO₂ e FG-Óleo.

Os espectros consistiram das bandas principais em 3400-3200 cm⁻¹ (ombro largo, representando o estiramento de OH acoplado à ligação de hidrogênio), 3281 cm⁻¹ (Amida-A, correspondente ao alongamento de NH acoplado com ligação de hidrogênio), 2920-2918 cm⁻¹ (Amida-B, alongamento CH, CH ligado a dupla ligação, acoplado com alongamento NH), 1630 cm⁻¹ (Amida-I, ilustrando C=O estiramento/ ligação de hidrogênio acoplado com COO⁻), 1531 cm⁻¹ (Amida II, apresentando as vibrações de grupos N-H e vibrações de estiramento de grupos C-N) e 1238 cm⁻¹ (Amida-III, ilustrando as vibrações no plano de grupos C – N e N – H de amida ligada bem como transmissões decorrentes de vibrações de oscilação a partir grupos CH₂ do esqueleto de glicina e cadeias laterais de prolina) (MUYONGA et al., 2004).

O pico no comprimento de onda de 1034-1036 cm⁻¹ em todas as amostras dos filmes estão relacionadas ao grupo OH, devido principalmente ao glicerol (adicionado como plastificante) e a matriz de gelatina (HOQUE et al., 2011). Neste pico, houve um ligeiro deslocamento da banda do FG-Controle e FG-Óleo (1034 cm⁻¹) para o FG-CO₂ (1036 cm⁻¹).

Indicando que o glicerol pode ter sido removido com a passagem do CO₂ durante a despressurização do sistema, reduzindo sua interação, o que corrobora com o menor IAA% e a rugosidade observada no FG-CO₂ na MEV em relação ao FG-Controle.

A transmissão na faixa 3400-3200 cm⁻¹, que corresponde às vibrações de alongamento de OH e NH, foi mais ampla no FG-Controle em comparação com os FG-Óleo e FG-CO₂. Apesar de não ter havido deslocamento na Amida-A, o alargamento desta faixa pode indicar a presença de ligações de hidrogênio entre as cadeias de gelatina, com maior interação intermolecular no FG-Controle, seguida de menor amplitude da amida A no FG-CO₂ e no FG-Óleo. Isso demonstra a interrupção da interação proteína-proteína com a passagem do CO₂ supercrítico nos filmes e maiores extensões no FG-CO₂. Isso é devido à ação plastificante causada pelo CO₂ supercrítico, que incha o filme, ampliando sua estrutura e quebrando as ligações de hidrogênio da amida A, formando espaços vazios na estrutura, representado pelos microporos observados na MEV no filme FG-CO₂.

O CO₂ produz um efeito de inchaço que gera mobilidade das cadeias poliméricas e pode, conseqüentemente, reduzir a penetração do feixe IR, de modo que as interações da gelatina não sejam tão intensas quando o óleo é impregnado. Isso indica que o efeito de inchaço pode ser parcialmente irreversível e a ordenação das cadeias poliméricas após a despressurização é modificada. Essa menor amplitude da banda Amida-A de filmes FG-Óleo, em comparação ao FG-Controle, sugere que a incorporação de óleos essenciais no filme de gelatina poderia interromper a extensão, causando maior disponibilidade desses grupos (TONGNUANCHAN et al., 2012) que podem estar associados à interação dos grupos funcionais de proteína e dos grupos funcionais de óleo essencial (BAHRAM et al., 2014).

O CO₂ supercrítico pode levar ao rompimento das interações gelatina-gelatina via ligação de hidrogênio, resultando em uma rede mais frouxa., o que reflete no aumento da flexibilidade e da diminuição da força encontrada no FG-Óleo em comparação ao FG-Controle. Portanto, a pressurização e a impregnação do OE em filmes de gelatina tiveram impacto na estrutura secundária de gelatina e interação intermolecular, bem como rearranjo molecular das moléculas de gelatina nos filmes resultantes.

Todas as bandas Amidas (I, II e II) sofreram reduções no filme FG-CO₂, seguidas pelo FG-Óleo. A redução na intensidade da banda Amida-I pode sugerir que o CO₂ supercrítico afeta a estrutura helicoidal da gelatina, o que reduziu o número de onda de 1632 cm⁻¹ no FG-Controle para 1630 cm⁻¹ nos filmes FG-CO₂ e FG-Óleo. A banda Amida-I tem sido amplamente utilizada

para análise de infravermelho visando determinar a estrutura secundária de proteínas e gelatinas (MUYONGA et al., 2004).

A amida-B sofreu uma sutil redução no número de onda no FG-Controle em comparação ao FG-CO₂ e aumento no FG-Óleo. Houve mudanças no número de onda em 2852 cm⁻¹, notado no FG-Controle, para 2850 cm⁻¹ no FG-CO₂ e aumento no FG-Óleo para 2854 cm⁻¹. Esses picos correspondem a região da Amida-B, atribuídos às vibrações de estiramento simétricas e assimétricas do C-H alifático nos grupos CH₃ e CH₂, respectivamente. As bandas de estiramento assimétricas do metileno apresentaram maior amplitude de ambos os picos no filme FG-Óleo. A maior amplitude desses picos, associados ao estiramento do metileno, poderia ser uma sugestão indireta da presença de óleo impregnado por CO₂ no FG-Óleo, corroborando com as bolhas de óleos observadas na MEV.

Com base nos dados que mostram a morfologia microscópica e a estrutura da fase molecular dos filmes, observa-se que o FG-Controle (sem OE e sem submissão ao CO₂ supercrítico) exibiu uma rede homogênea com a presença de maior fase ordenada, com interações mais intensas de proteína-proteína. Em geral, os FG-CO₂ apresentaram maior diminuição na intensidade dos picos principais em relação ao filme FG-Óleo e FG-Controle. Essas mudanças indicam maior desordem na estrutura molecular da gelatina (MUYONGA et al., 2004), ou seja, o CO₂ pode causar desordem na interação proteína-proteína devido seu potencial plastificante e de dilatação no filme. Além, de confirmar a interação do OE com as proteínas no filme impregnado.

3.4. PROPRIEDADES MECÂNICAS E ESPESSURA

Geralmente, a resistência à tração e o alongamento adequados são necessários para que os filmes resistam ao estresse externo e mantenham a integridade durante as aplicações em alimentos. Na Tabela 2, pode ser observado que FG-CO₂ não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$) no desempenho mecânico em relação ao FG-Controle. Nos estudos realizados por Goñi et al. (2016) e Medeiros et al. (2017), o CO₂ também demonstrou ter pouco impacto sobre a resistência à tração de filmes poliméricos LLDPE.

Tabela 2. Propriedades mecânicas e espessura dos filmes FG-Controle, FG-CO₂ e FG-Óleo.

Filmes	RM (Mpa)	E %	Espessura (mm)
FG-Controle	14,28±0,30 ^a	53,74±4,25 ^b	0,099±0,03 ^b
FG-CO ₂	13,06±0,45 ^a	55,75±4,67 ^b	0,102±0,003 ^b
FG-Óleo	9,97±1,2 ^b	94,88±3,79 ^a	0,114±0,01 ^a

* Média ± DP (n=3). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores ($p \leq 0,05$). RM: Resistência mecânica; E%: Elongação.

O filme FG-Óleo apresentou menor valor na resistência mecânica ($p \leq 0,05$) e aumento do % de alongação ($p \leq 0,05$) em relação aos filmes FG-Controle e FG-CO₂. Este comportamento pode ter ocorrido devido à separação da rede do filme causada pela incorporação do OE entre as cadeias do polímero, criando uma estrutura descontínua, ou seja, o OE agiu como plastificante (BONILLA E SOBRAL, 2016). A incorporação de óleo/lipídio em filmes à base de proteína pode impedir a interação proteína-proteína e fornece flexibilidade ao filme, reduzindo a RT (LIMPISOPHON et al., 2010). Comportamento semelhante foi observado em alguns estudos, com filmes de gelatina e diferentes tipos de óleos (TONGNUANCHAN et al., 2016); filme à base de proteína de chia usando óleo essencial de cravo (CAPITANI et al., 2016); e filmes feitos por extrusão (SOLANO E GANTE, 2012).

No entanto, no estudo de Li et al. (2018), ao usar β - ciclodextrina-timol em filmes de gelatina, foram observados a redução da resistência à tração e alongamento dos filmes. A rede polimérica ficou mais frouxa devido ao grande número de complexos adicionados. Essas mudanças podem ser causadas pela rede de densidade mais baixa, resultado da adição de partículas extras na matriz polimérica. Orsuwan e Sothornvit (2018) relataram que a incorporação de óleo essencial de alho em filmes ativos de nanocompósitos de farinha de banana não alterou a resistência à tração, mas reduziu o alongamento. Portanto, o tipo de matriz polimérica e a concentração de óleo influenciam significativamente as propriedades mecânicas.

Além disso, uma interação entre as cadeias de proteínas de gelatina e componentes químicos presentes no OE resultaram no aumento da espessura ($p \leq 0,05$) do filme FG-Óleo, em relação aos outros. Vários estudos sobre filmes de gelatina com óleos produzidos por técnica de fundição, usando emulsificantes (LIMPISOPHON et al., 2010; TONGNUANCHAN et al., 2016; EJAZ et al., 2018) ou complexos de inclusão para incorporar compostos bioativos (LI et al., 2018; WU et al., 2018), também relataram tal comportamento. Isso também é observado em filmes que usam diferentes matrizes (CAPITANI et al., 2016; ALPARSLAN E BAYGAR, 2017). A espessura não foi alterada em filmes incorporados com óleos formados por extrusão (SOLANO E GANTE, 2012). No entanto, o desenvolvimento de materiais biodegradáveis por

extrusão é limitado para pesquisa em escala de laboratório, devido à falta de compreensão do comportamento e interações químicas entre os componentes, além dos vários parâmetros do processamento que precisam ser considerados (HANANI et al., 2012), incluindo altas temperaturas.

A incorporação de óleos essenciais afeta a continuidade da matriz do polímero, levando a mudanças físicas, que depende das interações específicas dos componentes do polímero-óleo. Geralmente, a estrutura do filme é enfraquecida pela adição de óleo (CHIRALT E ATAR, 2016).

3.5 COR, TRANSMISSÃO DE LUZ E TRANSPARÊNCIA DE FILMES

Os parâmetros (L^* , a^* , b^* e ΔE^*) demonstram que a cor dos filmes foi afetada pela incorporação do OE (Tabela 3). Os valores de a^* e ΔE^* do filme FG-Controle e FG-CO₂ não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$). O FG-Óleo apresentou maior influência na luminosidade (L^*), cor amarela (b^*) e na diferença total de cores (ΔE^*) dos filmes ($p \leq 0,05$), exibindo a cor amarelada mais intensa devido ao processo de oxidação do óleo e ao efeito de dispersão de luz do OE na matriz do filme. Esse comportamento também foi relatado por vários estudos com filme de gelatina incorporado de óleo (SHAHBAZI, 2017; SILVA et al., 2018; THEERAWITAYAAART et al., 2019). A menor luminosidade do FG-Óleo pode evitar a oxidação dos alimentos embalados e a degradação pela luz visível e luz UV, o que resulta na perda de nutrientes, descoloração ou perda de odor (ZHANG et al., 2019).

Tabela 3. Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE^*) dos filmes FG-Controle, FG-CO₂ e FG-Óleo.

Filmes	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
FG-Controle	87,75±0,60 ^a	0,74±0,04 ^a	0,67±0,03 ^c	7,69±0,77 ^b
FG-CO ₂	86,87±0,39 ^b	0,52±0,03 ^{a,b}	4,28±0,59 ^b	7,36±0,32 ^b
FG-Óleo	86,56±0,24 ^c	-0,84±0,04 ^b	10,98±0,51 ^a	9,43±0,50 ^a

* Média ± DP (n=3). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores ($p \leq 0,05$).

O filme FG-Óleo apresentou menor % de passagem de luz e menor valor de transparência ($p \leq 0,05$) em relação aos outros filmes (Tabela 4), ou seja, eles são mais opacos. Esses resultados sugerem que, além dos benefícios antioxidantes proporcionados pelo OE, os filmes também apresentaram melhores propriedades de barreira à luz, especialmente a luz ultravioleta, um poderoso agente oxidante de lipídios. Esse atributo de barreira à luz é

geralmente atribuído à composição de compostos secundários presentes no OE, o que é interessante para embalar sistemas alimentares sensíveis ao efeito da luz UV. Boas barreiras à luz em filmes de gelatina com óleo foram observadas por vários estudos (LI et al., 2014; ADILAH E HANANI, 2016; THEERAWITAYAART et al., 2019). Ye et al. (2017) e Wu et al. (2018) observaram que quanto maior o percentual de ativos, melhor as propriedades de barreira à luz. A adição de óleos essenciais pode mudar a cor nativa do filme e o grau de mudança depende da sua concentração (CAPITANI et al., 2016), que pode ser atribuído à espessura do filme e cor do OE (ALPARSLAN E BAYGAR, 2017).

Tabela 4. Transmissão de luz e transparência dos filmes FG-Controle, FG-CO₂ e FG-Óleo.

Filmes	Transmitância de luz (%) em diferentes comprimentos de onda (nm)								Valor de transparência
	200	280	350	400	500	600	700	800	
FG-Controle	0,1	0,6	53,0	63,0	71,9	73,6	77,6	77,3	0,9 ^c
FG-CO ₂	0,2	10,6	60,4	66,7	70,9	70,4	73,5	72,3	1,4 ^b
FG-Óleo	0,1	1,2	36,5	45,3	53,7	58,1	61,2	63,7	2,2 ^a

* Média ± DP (n = 3). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (p≤0,05).

3.6 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (ATG)

Os termogramas de ATG revelam o comportamento da degradação térmica dos filmes FG-Controle, FG-CO₂ e FG-Óleo (Fig. 4).

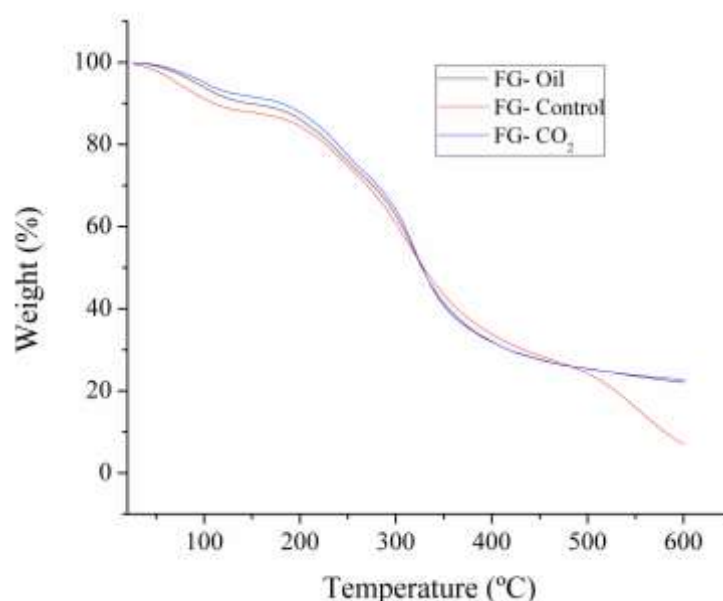


Figura 4. Curvas de ATG dos filmes FG-Controle, FG-CO₂ e FG-Óleo.

Os filmes FG-Controle e FG-CO₂ exibiram três grandes estágios de perda de peso, enquanto que o filme FG-Óleo apresentou quatro estágios. O primeiro estágio de perda de peso foi devido à evaporação da água livre dos filmes. O FG-Óleo teve maior perda de peso e menor temperatura do que os outros filmes, devido presença do OE (hidrofóbico) que fornece maior quantidade de água livre na matriz de filme (Tabela 5).

Tabela 5. Temperaturas de degradação térmica (Td, °C) e perda de peso (Δw , %) dos filmes FG-Controle, FG-CO₂ 30% e FG-Óleo.

Amostras	$\Delta 1$		$\Delta 2$		$\Delta 3$		$\Delta 4$		Resíduo (%)
	Td1	$\Delta w1$	Td2	$\Delta w2$	Td3	$\Delta w3$	Td4	$\Delta w4$	
FG-Controle	56,22	10,18	196,14	17,46	295,01	50,19	-	-	22,18
FG-CO ₂	67,93	8,83	204,86	18,58	299,28	49,63	-	-	22,95
FG-Óleo	49,98	11,82	200,30	15,89	282,46	45,88	511,50	18,92	7,49

A perda de peso no segundo estágio foi principalmente associada à perda da fração proteica de baixo peso molecular e compostos do glicerol (plastificante), assim como a água ligada estruturalmente (HOQUE et al., 2011). Notou-se que a Td₂ e a Δw_2 do FG-Óleo foram inferiores aos dos outros filmes. Isto pode ser devido à menor proporção de glicerol na matriz do filme quando o óleo é impregnado com CO₂ supercrítico (Tabela 5). No entanto, esta faixa

de temperatura foi superior ao ponto de ebulição do glicerol (182 °C), em que alguns tipos de interação, como a ligação de hidrogênio, poderiam ser formados entre as frações de proteínas e glicerol (GUERRERO et al., 2011).

A perda de peso na terceira fase foi associada à degradação ou decomposição de frações proteicas de maior interação ou tamanho. Notou-se que o FG-Controle obteve a maior perda de massa nessa fase devido a maior interação proteína-proteína evidenciada pelo FTIR. As primeiras perdas de massas Δw_1 , Δw_2 e Δw_3 foram relacionadas com a perda de água livre, glicerol e degradação de frações proteicas na matriz do filme, respectivamente.

As maiores temperaturas de degradação encontradas nos filmes FG-CO₂ e FG-Controle são principalmente devido a maior interação entre as moléculas de gelatina, produzindo um material de rede de filme mais denso e forte, o que corrobora com a alta resistência mecânica encontradas nesses filmes. A adição de OE à gelatina pode diminuir a interação gelatina-gelatina, resultando em uma rede mais fraca causado pelas gotículas de OE distribuídas no filme, reforçado pela menor resistência mecânica.

Uma rede um pouco menos densa pode ser formada em FG-Óleo em comparação aos outros filmes, porque OE limita o alinhamento próximo das cadeias de gelatina, o que, conseqüentemente, facilita sua decomposição. A quarta fase da perda de peso foi observada apenas para o filme FG-Óleo, provavelmente devido à perda de componentes que são estáveis em altas temperaturas.

Neste estudo, o resíduo no FG-Óleo obteve o menor percentual, devido ao enfraquecimento das ligações do filme causado pela adição do OE, levando a um maior grau de degradação térmica e menor estabilidade térmica. Estudos relatam que, em geral, filmes de gelatina incorporados com óleo têm menor massa residual de degradação térmica em comparação com filmes livres de óleo (HOQUE et al., 2011; TONGNUANCHAN et al., 2014; TONGNUANCHAN et al., 2015). Isso confirma as interações mais fracas entre as moléculas de proteínas na rede do filme FG-óleo, evidenciado pela resistência à tração encontrada.

Portanto, pode-se inferir que a impregnação do OE teve impacto pronunciado na estabilidade térmica do filme de gelatina quando comparado ao FG-Controle, corroborando que scCO₂ causa algumas alterações na estrutura do filme.

4 CONCLUSÃO

O estudo da impregnação do óleo essencial *Piper divaricatum* em filme de gelatina de peixe (*Cynoscion acoupa*) por CO₂ supercrítico apresentou maior atividade antioxidante na condição operacional à 100 bar e 60 min, com distribuição heterogênea do óleo essencial, maior flexibilidade, amarelecimento e opacidade, e diminuição da estabilidade térmica. Assim, o filme é apresentado como um material potencial para ser usado como uma embalagem ativa para alimentos.

REFERÊNCIAS

- ADILAH, Z. A. M.; HANANI, Z. A. N. (2016) Active packaging of fish gelatin films with *Morinda citrifolia* oil. **Food Bioscience**, 16: 66–71.
- ALPARSLAN, Y.; BAYGAR, T. (2017) Effect of chitosan film coating combined with orange peel essential oil on the shelf life of deepwater pink shrimp. **Food and Bioprocess Technology**, 10: 842–853.
- AZEREDO, H. M. C. D. (2009) Nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**, 42(9): 1240–1253.
- BAHRAM, S.; REZAEI, M.; SOLTANI, M.; KAMALI, A.; OJAGH, S. M.; ABDOLLAHI, M. (2014) Whey protein concentrate edible film activated with cinnamon essential oil. **Journal of Food Processing and Preservation**, 38: 1251–1258.
- BEZERRA, F. W. F.; COSTA, W. A. D.; OLIVEIRA, M. S. D.; AGUIAR ANDRADE, E. H. D.; CARVALHO, R. N. D. (2018) Transesterification of palm pressed-fibers (*Elaeis guineensis* Jacq.) oil by supercritical fluid carbon dioxide with entrainer ethanol. **Journal of Supercritical Fluids**, 136: 136–143.
- BOF, M. J.; JIMÉNEZ, A.; LOCASO, D. E.; GARCÍA, M. A.; CHIRALT, A. (2016) Grapefruit seed extract and lemon essential oil as active agents in corn starch–chitosan blend films. **Food Bioprocess Technology**, 9: 2033–2045.
- BONILLA, J.; SOBRAL, P. J. A. (2016) Investigation of the physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts. **Food Bioscience**, 16: 17–25.
- BURGOS, N.; ARMENTANO, I.; FORTUNATI, E.; DOMINICI, F.; LUZI, F.; FIORI, S.;

CRISTOFARO, F.; VISAI, L.; JIMÉNEZ, A.; KENNY, J. M. (2017) Functional properties of plasticized bio-based poly(lactic acid) _poly(hydroxybutyrate) (PLA_PHB) films for active food packaging. **Food and Bioprocess Technology**, 10: 770–780.

CAPITANI, M. I.; MATUS-BASTO, A.; RUIZ-RUIZ, J. C.; SANTIAGO-GARCÍA, J. L.; BETANCUR-ANCONA, D. A.; NOLASCO, S. M.; TOMÁS, M. C.; SEGURA-CAMPOS, M. R. (2016) Characterization of biodegradable films based on *Salvia hispanica* L. protein and mucilage. **Food and Bioprocess Technology**, 9: 1276–1286.

CASAS, L.; MANTELL, C.; OSSA, E. J. M. D. (2017) Impregnation of mango leaf extract into a polyester textile using supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, 128: 208–217.

CEJUDO BASTANTE, C.; CASAS CARDOSO, L.; FERNÁNDEZ PONCE, M. T.; MANTELL SERRANO, C.; MARTÍNEZ DE LA OSSA-FERNÁNDEZ, E. J. (2018) Characterization of olive leaf extract polyphenols loaded by supercritical solvent impregnation into PET/PP food packaging films. **Journal of Supercritical Fluids**, 140: 196–206.

CEJUDO BASTANTE, C.; CARDOSO, L. C.; SERRANO, C. M.; OSSA, E. J. M. D. (2017) Supercritical impregnation of food packaging films to provide antioxidant properties. **The Journal of Supercritical Fluids**, 128: 200–207.

CEJUDO BASTANTE, C.; CRAN, M. J.; CARDOSO, L. C.; SERRANO, C. M.; DE, E. J. M.; BIGGER, S. W. (2019) Effect of supercritical CO₂ and olive leaf extract on the structural, thermal and mechanical properties of an impregnated food packaging film. **The Journal of Supercritical Fluids**, 145: 181–191.

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

COSTA, V. P.; BRAGA, M. E. M.; GUERRA, J. P.; DUARTE, A. R. C.; DUARTE, C. M. M.; LEITE, E. O. B., et al. (2010) Development of therapeutic contact lenses using a supercritical solvent impregnation method. **Journal of Supercritical Fluids**, 52(3): 306–316.

COZMUTA, A. M.; TURILA, A.; APJOK, R.; CIOCIAN, A.; COZMUTA, L. M.; PETER, A.; et al. (2015) Preparation and characterization of improved gelatin films incorporating hemp and sage oils. **Food Hydrocolloids**, 49: 144-155.

DENG, L.; LI, X.; MIAO, K.; MAO, X.; HAN, M.; LI, D.; MU, C.; GE, L. (2020) Development of disulfide bond crosslinked gelatin/ε-polylysine active edible film with antibacterial and

antioxidant activities. **Food and Bioprocess Technology**, 13: 577–588.

DÍEZ-MUNICIO, M.; MONTILLA, A.; HERRERO, M.; OLANO, A.; IBÁÑEZ, E. (2011) Supercritical CO₂ impregnation of lactulose on chitosan: A comparison between scaffolds and microspheres form. **The Journal of Supercritical Fluids**, 57(1), 73–79.

EJAZ, M.; ARFAT, Y. A.; MULLA, M.; AHMED, J. (2018) Zinc oxide nanorods / clove essential oil incorporated Type B gelatin composite films and its applicability for shrimp packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, 15, 113–121.

GÓMEZ-ESTACA, J.; BRAVO, L.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; ALEMÁN, A.; MONTERO, P. (2009) Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. **Food Chemistry**, 112(1), 18–25.

GOÑI, M. L.; GAÑÁN, N. A.; BARBOSA, S. E.; STRUMIA, M. C.; MARTINI, R. E. (2017). CO₂ -assisted impregnation of LDPE / sepiolite nanocomposite films with insecticidal terpene ketones: Impregnation yield , crystallinity and mechanical properties assessment. **The Journal of Supercritical Fluids**, 130: 337–346.

GOÑI, M. L.; GAÑÁN, N. A.; STRUMIA, M. C.; MARTINI, R. E. (2016) Eugenol-loaded LLDPE films with antioxidant activity by supercritical carbon dioxide impregnation. **The Journal of Supercritical Fluids**, 111: 28–35.

GUERRERO, P.; HANANI, Z. A. N.; KERRY, J. P.; CABA, K. D. (2011) Characterization of soy protein-based films prepared with acids and oils by compression. **Journal of Food Engineering**, 107(1): 41–49.

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

LI, J.; MIAO, J.; WU, J.; CHEN, S.; ZHANG, Q. (2014) Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. **Food Hydrocolloids**, 37: 166–173.

LI, M.; ZHANG, F.; LIU, Z.; GUO, X.; WU, Q.; QIAO, L. (2018) Controlled release system by active gelatin film incorporated with β -cyclodextrin-thymol inclusion complexes. **Food and Bioprocess Technology**, 11: 1695–1702.

LIMPISOPHON, K.; TANAKA, M.; OSAKO, K. (2010). Characterisation of gelatin-fatty acid

emulsion films based on blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin. **Food Chemistry**, 122(4): 1095–1101.

MARTUCCI, J. F.; GENDE, L. B.; NEIRA, L. M.; RUSECKAITE, R. A. (2015) Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. **Industrial Crops & Products**, 71: 205–213.

MEDEIROS, G. R.; FERREIRA, S. R. S.; CARCIO, B. A. M. (2017) High pressure carbon dioxide for impregnation of clove essential oil in LLDPE films. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 41: 206–215.

MILOVANOVIC, S.; STAMENIC, M.; MARKOVIC, D.; IVANOVIC, J.; ZIZOVIC, I. (2015) Fluids supercritical impregnation of cellulose acetate with thymol. **The Journal of Supercritical Fluids**, 97: 107–115.

MIR, S. A.; SHAH, M. A.; DAR, B. N.; WANI, A. A.; GANAI, S. A.; NISHAD, J. (2017) Supercritical impregnation of active components into polymers for food packaging applications. **Food and Bioprocess Technology**, 10: 1749–1754.

MUYONGA, J. H.; COLE, C. G. B.; DUODU, K. G. (2004) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry**, 86(3): 325–332.

NUR HANANI, Z.A.; BEATTY, E.; ROOS, Y. H.; MORRIS, M. A.; KERRY, J.P. (2012) Manufacture and characterization of gelatin films derived from beef, pork and fish sources using twin screw extrusion. **Journal of Food Engineering**, 113: 606–614.

OLIVEIRA, M. S. D.; CRUZ, J. N. D.; SILVA, S. G.; COSTA, W. A. D.; SOUSA, S. H. B. D.; BEZERRA, F. W. F.; et al. (2019) Phytochemical profile, antioxidant activity, inhibition of acetylcholinesterase and interaction mechanism of the major components of the *Piper divaricatum* essential oil obtained by supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, 145: 74–84.

ORSUWAN, A.; SOTHORNVIT, R. (2018) Active banana flour nanocomposite films incorporated with garlic essential oil as multifunctional packaging material for food application. **Food and Bioprocess Technology**, 11: 1199–1210.

REDDY, N. J.; NAGOOR VALI, D.; RANI, M.; RANI, S. S. (2014) Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by *Piper longum* fruit. **Materials Science and Engineering C**, 34(1): 115–122.

- ROJAS, A.; CERRO, D.; TORRES, A.; JOSÉ, M.; GUARDA, A.; ROMERO, J. (2015) Supercritical impregnation and kinetic release of 2-nonanone in LLDPE films used for active food packaging. **The Journal of Supercritical Fluids**, 104, 76–84.
- SAMSALEE, N.; SOTHORNVIT, R. (2020) Characterization of food application and quality of porcine plasma protein–based films incorporated with chitosan or encapsulated turmeric oil. **Food and Bioprocess Technology**, 3: 488–500.
- SHAHBAZI, Y. (2017) The properties of chitosan and gelatin films incorporated with ethanolic red grape seed extract and Ziziphora clinopodioides essential oil as biodegradable materials for active food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, 99: 746–753.
- SHEN, Z.; HUVARD, G. S.; WARRINER, C. S.; MC, M.; BANYASZ, J. L.; MISHRA, M. K. (2008) CO₂ -assisted fiber impregnation. **Polymer**, 49: 1579–1586.
- SILVA, N. D. S.; HERNÁNDEZ, E. J. G. P.; ARAÚJO, C. D. S. A.; JOELE, M. R. S. P.; LOURENÇO, L. D. F. H. (2018) Development and optimization of biodegradable fish gelatin composite film added with buriti oil. **CYTA - Journal of Food**, 16(1): 340–349.
- SOLANO, A. C. V.; GANTE, C. R. (2012) Two different processes to obtain antimicrobial packaging containing natural oils. **Food and Bioprocess Technology**, 5: 2522–2528.
- SOUZA, C. A. D.; DIAS, A. M. A.; SOUSA, H. C.; TADINI, C. C. (2014) Impregnation of cinnamaldehyde into cassava starch biocomposite films using supercritical fluid technology for the development of food active packaging. **Carbohydrate Polymers**, 102: 830–837.
- SPAN, R.; WAGNER, W. (1996) A new equation of state for carbon dioxide covering the fluid region from the triple-point temperature to 1100 K at pressures up to 800 MPa. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, 25(6): 1509–1596.
- THEERAWITAYAART, W.; PRODPRAN, T.; BENJAKUL, S. (2019) Properties of films from fish gelatin prepared by molecular modification and direct addition of oxidized linoleic acid. **Food Hydrocolloids**, 88: 291–300.
- TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. (2012) Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. **Food Chemistry**, 134(3): 1571–1579.
- TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. (2014) Structural, morphological and thermal behaviour characterisations of fish gelatin film incorporated with basil and

citronella essential oils as affected by surfactants. **Food Hydrocolloids**, 41: 33–43.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. (2016) Mechanical, thermal and heat sealing properties of fish skin gelatin film containing palm oil and basil essential oil with different surfactants. **Food Hydrocolloids**, 56: 93–107.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; NILSUWAN, K. (2015) Emulsion film based on fish skin gelatin and palm oil: Physical, structural and thermal properties. **Food Hydrocolloids**, 48: 248–259.

TORRES, A.; ROMERO, J.; MACAN, A.; GUARDA, A.; JOSÉ, M. (2014) Near critical and supercritical impregnation and kinetic release of thymol in LLDPE films used for food packaging. **The Journal of Supercritical Fluids**, 85: 41–48.

VARONA, S.; RODRÍGUEZ-ROJO, S.; MARTÍN, Á.; COCERO, M. J.; DUARTE, C. M. M. (2011) Supercritical impregnation of lavandin (*Lavandula hybrida*) essential oil in modified starch. **Journal of Supercritical Fluids**, 58(2): 313–319.

WANG, Y.; XIA, Y.; ZHANG, P.; YE, L.; WU, L.; HE, S. (2017) Physical characterization and pork packaging application of chitosan films incorporated with combined essential oils of cinnamon and ginger. **Food and Bioprocess Technology**, 10: 503–511.

WEIDNER, E. (2018) Impregnation via supercritical CO₂—What we know and what we need to know. **Journal of Supercritical Fluids**, 134: 220–227.

WU, J.; SUN, X.; GUO, X.; GE, S.; ZHANG, Q. (2017) Physicochemical properties, antimicrobial activity and oil release of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil. **Aquaculture and Fisheries**, 2(4): 185–192.

YE, Y.; ZHU, M.; MIAO, K.; LI, X.; LI, D.; MU, C. (2017) Development of antimicrobial gelatin-based edible films by incorporation of trans-anethole/ β -cyclodextrin inclusion complex. **Food and Bioprocess Technology**, 10: 1844–1853.

ZHANG, X.; MA, L.; YU, Y.; ZHOU, H.; GUO, T.; DAI, H.; ZHANG, Y. (2019) Physico-mechanical and antioxidant properties of gelatin film from rabbit skin incorporated with rosemary acid. **Food Packaging and Shelf Life**, 19(2): 121–130.

CAPÍTULO III: Estudo dos métodos de fundição e impregnação por CO₂ supercrítico de óleo essencial *Piper divaricatum* em filmes de peixe (*Cynoscion acoupa*)

Resumo

Foram utilizadas duas técnicas para produzir filmes biodegradáveis com propriedades antioxidantes, fundição (método convencional) e impregnação por CO₂ supercrítico (scCO₂), a partir de gelatina da pele de peixe *Cynoscion acoupa* com diferentes concentrações de óleo essencial (OE) *Piper divaricatum*. Os filmes com a adição de 20% (71,97±1,71) e 30% (79,17±1,01) de OE produzidos por fundição apresentaram os maiores percentuais de inibição da atividade antioxidante IAA% ($p>0,05$). Os filmes elaborados por impregnação por scCO₂ apresentaram menor atividade antioxidante que, no entanto, foi melhorada com o aumento do teor de OE de 20% (23,57±1,45) para 30% (33,66±2,42) ($p\leq 0,05$). Os filmes impregnados por scCO₂ apresentaram superfície heterogênea, mais resistentes à tração e à temperatura. Os produzidos por fundição apresentaram superfície homogênea, maior proteção a luz UV e mais resistentes a umidade. Apesar de a técnica de fundição ter apresentado atividade antioxidante mais elevada nos filmes de gelatina com OE, a impregnação por scCO₂ também pode ser considerada viável para elaboração dessas embalagens ativas. No entanto, sugere-se a realização de outros estudos para solucionar as limitações encontradas.

Palavras-chave: Filmes ativos; *casting*; impregnação por solvente supercrítico; atividade antioxidante; pescada amarela.

1 INTRODUÇÃO

Novas tecnologias de embalagem de alimentos estão em ascensão devido à crescente demanda do mercado consumidor por materiais biodegradáveis, que possam substituir total e/ou parcialmente as embalagens plásticas, oriundas do petróleo. As embalagens ativas atendem a esse objetivo superando algumas limitações das embalagens convencionais, por apresentar características que ultrapassam a barreira física entre o produto e o exterior, atuando como barreira contra o crescimento de microrganismos e/ou a oxidação do produto, graças à inclusão de aditivos no material da embalagem (BELIZÓN et al., 2018; SUDERMAN E SARBON, 2020).

A gelatina tem sido comumente usada para desenvolver filmes biodegradáveis devido à sua relativa abundância, biodegradabilidade, boa capacidade de formação de filme e propriedades mecânicas, como barreiras a umidade e gases (LIN et al., 2017). A gelatina pode ser extraída de resíduos de ossos e peles gerados pela indústria de processamento de peixes, já que o rendimento da produção de filés é de apenas 30 a 50%, e o restante são resíduos descartados inadequadamente na natureza (MEDEIROS et al., 2019). Um dos peixes mais comercializados na região Norte do Brasil é a pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) cujo processamento gera uma grande quantidade de resíduos que podem ser reaproveitados como matéria-prima para elaboração de filmes biodegradáveis.

Os filmes biodegradáveis podem ser carreadores de aditivos funcionais, com propriedades aromatizantes, antioxidantes e antimicrobianas para extensão da vida útil de produtos alimentícios (GE et al., 2018). O enriquecimento com adição de substâncias naturais, como extratos ou óleos essenciais de plantas, podem ampliar a funcionalidade das embalagens a fim de produzir um biomaterial de embalagem ativo (JAHED et al., 2017).

O gênero *Piper* é o mais representativo da família Piperaceae compreendendo diversas variedades de pimentas. Muitas espécies apresentam alto rendimento de óleo essencial e excelentes propriedades antifúngicas, antioxidantes e anti-inflamatórias. A espécie vegetal *Piper divaricatum* possui raiz aromática e forte sabor de gengibre, com ampla distribuição na América Latina (VILHENA et al., 2019). O óleo essencial *Piper divaricatum* isolado por hidrodestilação e por scCO₂ possuem o metileugenol como composto encontrado em maior concentração e demonstraram possuir atividade antioxidante em todas as suas frações (OLIVEIRA et al., 2019).

Processos tradicionais, tais como fundição, mistura por fusão ou moldagem por compressão são comumente usados para incorporar óleos a filmes poliméricos. Estes dois últimos requerem altas temperaturas de processamento que podem degradar o composto ativo, devido sua sensibilidade à degradação. O método mais frequentemente usado para incorporar compostos voláteis a um polímero é o método de fundição ou *casting*. É um método simples e que requer longos tempos de secagem da solução filmogênica. Esta solução consiste em gelatina e plastificante, que pode ser adicionado emulsificantes ou surfactantes, para proporcionar uma dispersão estável e uniforme do óleo essencial na solução, que é vazada em placas e então seca por eliminação do solvente (WU et al., 2017).

A impregnação por solvente supercrítico (ISS) está sendo usada para incorporar compostos ativos em filmes. Este processo é caracterizado por condições de operações amenas e atmosfera de processamento inerte, especialmente adequada para incorporar óleo essencial, pois evita sua degradação e garante sua impregnação na matriz sólida devido à alta difusividade do CO₂ supercrítico (scCO₂) (ALMEIDA et al., 2013).

Em geral, o CO₂ é usado como solvente na impregnação e é o meio de transporte da substância ativa para a matriz polimérica. É comumente usado devido à alta solubilidade e difusividade, baixo custo e impacto ambiental, além de induzir um inchaço e efeito plastificante no polímero. Possui baixos parâmetros críticos (P_c = 7,4 MPa e T_c = 31,1 °C) e permite o processamento de materiais a temperaturas relativamente baixas. Ao final do processo, o CO₂ deixa o polímero devido à despressurização do sistema, resultando em um material sem vestígios de solvente (MARKOVIC et al., 2018).

Este estudo teve como objetivo avaliar a incorporação de diferentes concentrações de óleo essencial *Piper divaricatum* em filmes de gelatina de pele de *Cynoscion acoupa* pela técnica de fundição e de impregnação por scCO₂, para uso como material de embalagem ativa de alimentos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATÉRIA PRIMA

As peles da pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) foram doadas pela Costa Norte Comércio de Pescado Ltda. (Icoaraci, Brasil). O óleo de *Piper divaricatum* foi extraído por hidrodestilação em aparelho Clevenger, cedido pelo Herbário do Museu Emilio Goeldi (Belém, Brasil). Glicerol (Isofar, Glicerina PA com 99,5% de pureza) foi usado como plastificante e goma arábica (Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Brasil) como surfactante.

2.2 OBTENÇÃO DA GELATINA

A gelatina da pele da pescada amarela foi extraída de acordo com a metodologia descrita por Silva et al. (2018), com modificações no processo de secagem em estufa por Albuquerque et al. (2020). A secagem foi realizada a 50 °C por 16 h e posteriormente, a gelatina foi embalada a vácuo e armazenada a -18 °C.

2.3 FILME DE GELATINA COM ÓLEO ESSENCIAL POR MÉTODO DE FUNDIÇÃO

Os filmes de gelatina foram elaborados por fundição de acordo com a metodologia proposta por Gómez-Estaca et al. (2009). A gelatina foi dissolvida em água destilada (3% p/v) e então foi adicionado o glicerol (20% p/p de proteína) para obter a solução filmogênica (SF). A SF foi agitada e aquecida a 60 °C durante 30 min. Posteriormente, foram adicionados em temperatura ambiente, o OE a 10, 20 e 30% (p/p, com base na proteína) e a goma arábica a 30, 35, 40% (p/p com base no OE). As SFs foram homogeneizadas a 15.000 rpm durante 3 min usando homogeneizador (Tecnal, TE-102, Brasil). Em seguida, foram distribuídas em bandejas circulares de silicone e secas em estufa a 35 °C por 18 h. Após a secagem, os filmes obtidos foram armazenados em sacos plásticos sob vácuo e mantidos sob refrigeração. As amostras do filme de gelatina controle (FG-Controle) foram elaboradas da mesma forma sem a adição de óleo e emulsificante a SF.

2.4 FILME DE GELATINA COM IMPREGNAÇÃO POR scCO₂ DE ÓLEO ESSENCIAL

A impregnação por scCO₂ do OE nos filmes de gelatina foi realizada em autoclave de aço inoxidável (modelo 2777 1000, Top Industrie, França) com volume interno de 0,095 L (0,128 x 0,152 m) e capacidade máxima de operação de 300 bar e 350 °C. À autoclave foram acoplados: um colar de aquecimento (modelo 2777 1021, Top Industrie, França), agitador magnético (modelo 616 0100, Top Industrie, França), termopar (modelo TKA 15 x 20 HMP, Erciat, França), cabeçote de segurança (Modelo 728 0350, Top Industrie, França), disco de ruptura (Modelo 728 0400, Sitec, Suíça), transdutor de pressão (Modelo PA-23SY, Keller, Suíça), painel de controle (Modelo TS1070, MonitouchTechnoshot, Holanda), bomba de transferência de líquido, compressor (modelo CSA, Schulz S / A, Brasil), cilindro de CO₂ (99,9% de pureza, White Martins, Brasil) e um recirculador (modelo F08400796, Polyscience, EUA), conforme ilustrado na Fig. 1.

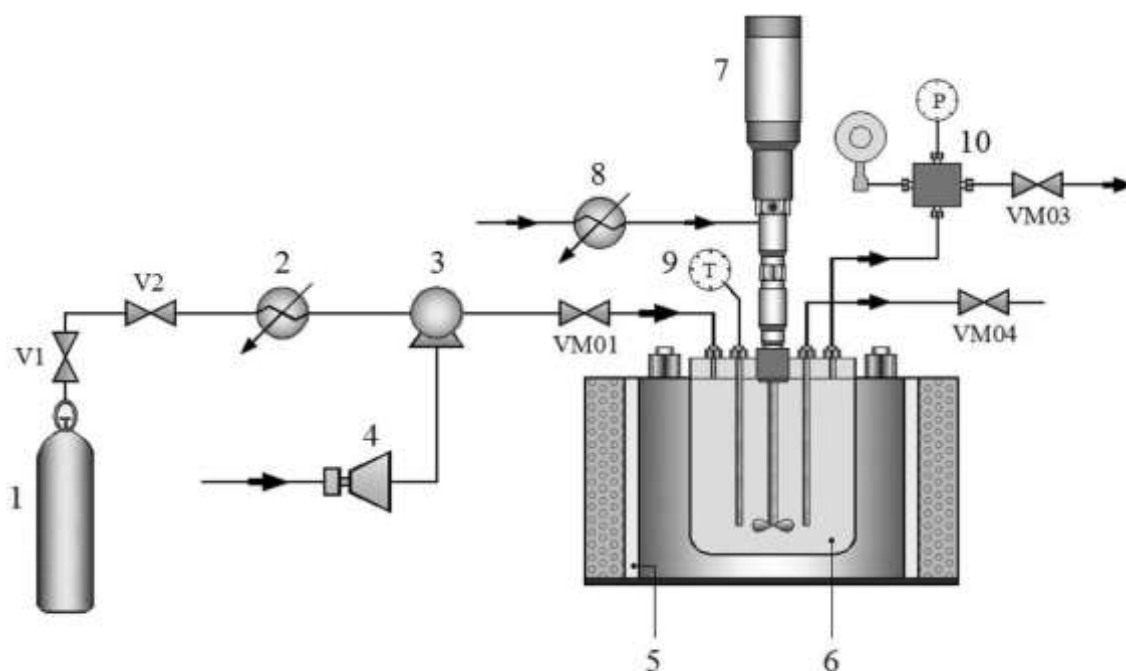


Figura 1. Representação esquemática do sistema ISS. 1. Tanque de CO₂; 2. Banho de resfriamento; 3. Bomba; 4. Compressor; 5. Colar de aquecimento; 6. Autoclave; 7. Agitador magnético; 8. Banho de resfriamento; 9. Termopar; 10. Cabeça de segurança e disco de ruptura; Válvulas de controle de fluxo V1-V2 / VM01-VM04 (adaptado de BEZERRA et al., 2018).

No processo de impregnação por scCO₂, as amostras do filme de gelatina controle (FG-Controle) foram cortadas no comprimento e largura máximos (12,5 cm x 3 cm), considerando as dimensões internas da autoclave, e então pesadas com massa de $0,5 \pm 0,04$ g, a fim de manter a similaridade das amostras. Posteriormente, foram fixadas em um suporte de aço inoxidável na posição vertical para evitar movimentação durante as etapas de pressurização e despressurização e inseridas na autoclave. As concentrações de OE foram de 10, 20 e 30% (p/p em relação à proteína) e foram depositadas na autoclave logo abaixo do filme. Após o fechamento do sistema, foram ajustadas no painel de controle a temperatura (35 °C) e a rotação do agitador (40 rpm), e então o CO₂ foi liberado até a pressão de 100 bar ser atingida.

As corridas de impregnação por scCO₂ foram realizadas em duplicata, a uma taxa de despressurização de 10 bar.min⁻¹. Esses parâmetros foram baseados em trabalhos anteriores (GOÑI et al., 2016, 2017; MEDEIROS et al., 2017; ALBUQUERQUE et al., 2020). Após a despressurização, os filmes foram retirados da autoclave e embalados a vácuo, protegidos da luz, e armazenados a 8 °C, até as análises de caracterização.

2.5 ANÁLISE DOS FILMES

Todos os filmes com diferentes concentrações de OE e o FG-Controle foram avaliados quanto a atividade antioxidante. As demais análises foram realizadas no FG-Controle e nos filmes com os maiores IAA% pela técnica de fundição (FG-Fundição) e por impregnação por scCO₂ (FG-CO₂).

2.5.1 Atividade antioxidante dos filmes

O percentual de inibição de atividade antioxidante (IAA%) foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Cejudo Bastante et al. (2017). Para a análise, 100 mg do filme foram mantidos em contato com 3,9 mL de solução de DPPH (6×10^{-5} mol.L⁻¹), por 30 minutos, em temperatura ambiente e protegidos da luz. O metanol foi usado como controle. Após esse período, as amostras foram lidas a 515 nm em espectrofotômetro UV-vis (Thermo Scientific, Evolution 60, Waltham, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicata e o índice de atividade antioxidante (IAA%) foi calculado usando a Eq. 1:

$$\text{IAA \%} = \frac{A_f - A_o}{A_o} \times 100 \quad (1)$$

Onde: A_o é a absorbância do controle e A_f é a absorbância da amostra.

2.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise de microscopia eletrônica de varredura foi feita em equipamento (Tescan, Vega 3 LMU, Dortmund, Alemanha), e as amostras foram banhadas em ouro com um metalizador (Quorum Technologies, SC7620, Inglaterra, Reino Unido), para permitir a condutividade elétrica necessária para a formação da imagem. Em seguida, elas foram observadas usando tensão de aceleração de 10 kV.

2.5.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram analisadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (Bruker Co., Ettlingen, Alemanha) em uma faixa espectral de 400 a 4000 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹.

2.5.4 Propriedades mecânicas e espessura

A espessura do filme foi avaliada em micrômetro digital de resolução de 0,001 mm (Insize, IP54, Brasil) e medidas aleatórias ao redor do filme. A resistência à tração (RT) e o percentual de alongação (E%) foram medidos em uma máquina de ensaio universal (Instron, EUA). Amostras retangulares (50 × 10 mm) foram utilizadas em todos os ensaios, com separação inicial da garra de 30 mm. Os testes foram conduzidos com velocidade constante da cruzeta de 30 mm.min⁻¹ até a quebra. A resistência à tração e o percentual de alongação foram registrados ao longo de cada teste. Todos os testes foram replicados oito vezes.

2.5.5 Solubilidade

Para determinar a solubilidade foi utilizada a metodologia descrita por Gontard et al. (1994). A matéria seca inicial foi obtida em estufa a 105 °C/24 h em amostras de filme de 2 cm de diâmetro. Após a primeira pesagem, as amostras foram imersas em recipientes contendo 50 mL de água. O sistema foi agitado em incubadora Shaker com agitação (Cielanb, modelo CE-725B) a 70 rpm por 24 h a 25 °C. Após este período, as amostras foram retiradas e secas (105 °C por 24 h) para determinação da matéria seca não dissolvida em água.

2.5.6 Análise de cor, transmissão de luz e transparência

A cor dos filmes foi determinada em colorímetro (CR-400/Konica Minolta, Tóquio, Japão), utilizando o sistema CIELab: L* (brilho), a* (verde com vermelho), b* (azul com amarelo), e a diferença total de cor (ΔE^* , utilizando a amostra FG-Controle como controle) foi calculada de acordo com Eq. 2.

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

Onde: ΔL^* , Δa^* e Δb^* são diferenças entre os parâmetros de amostra e controle.

A transmitância de luz ultravioleta (UV) e visível dos filmes foi medida em comprimentos de onda selecionados entre 200 e 800 nm, usando espectrofotômetro UV-Vis (Thermo Scientific, Evolution 60, Waltham, EUA). O valor de transparência do filme foi calculado de acordo com Eq. 3:

$$T = \frac{A_{600}}{x} \quad (3)$$

Onde: T é a transmitância em 600 nm, e x é a espessura do filme (mm).

2.5.7 Análise termogravimétrica (ATG)

Os filmes foram acondicionados em cadinhos de alumínio e varridos de 20 a 600 °C, a uma taxa de 10 °C.min⁻¹, em analisador termogravimétrico (DTG-60H, Shimadzu, EUA), sob atmosfera de nitrogênio e vazão de 50 mL.min⁻¹.

2.5.8 Análise estatística

Os dados experimentais foram analisados por análise de variância (ANOVA), com nível de confiança de 95%, por meio do software Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., Oklahoma, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS FILMES

A Tabela 1 apresenta a atividade antioxidante dos FG-Controle, FG-Fundição e FG-CO₂ dos filmes pelas técnicas de fundição e impregnação por scCO₂. O FG-Controle apresentou baixo IAA%, advinda provavelmente do potencial antioxidante da gelatina (KAVOOSI et al., 2017). E foi observado que a atividade antioxidante aumentou com a adição de maior quantidade de óleo nos filmes elaborados pelas duas técnicas. No entanto, não houve diferença (p>0,05) no FG-Fundição 20% comparado ao FG-Fundição 30%, assim como nos filmes por impregnação por CO₂, FG-CO₂ 10% com o FG-CO₂ 20%. O aumento da atividade antioxidante com a incorporação de óleo essencial em filmes também foi observado em outros estudos (TONGNUANCHAN et al., 2012; SILVA et al., 2018; ALBUQUERQUE et al., 2020; SHEN et al., 2021). As propriedades antioxidantes do óleo essencial de *Piper divaricatum* são devido à presença de metabólitos secundários, terpenóides e fenilpropanóides (OLIVEIRA et al., 2019), que podem auxiliar na inibição da oxidação de alimentos embalados.

Tabela 1. Atividade antioxidante dos FG-Controle, FG-Fundição e FG-CO₂.

Filmes	IAA %
FG-Controle	9,70±1,51 ^e
FG-Fundição 10%	52,21±2,82 ^b
FG-Fundição 20%	71,97±1,71 ^a
FG-Fundição 30%	79,17±1,01 ^a
FG-CO ₂ 10%	20,63±2,07 ^d
FG-CO ₂ 20%	23,57±1,45 ^d
FG-CO ₂ 30%	33,66±2,42 ^c

* Média ± DP (n = 2). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (p≤0,05). IAA %: inibição da atividade antioxidante.

Os IAA% do FG-Fundição 20% e 30% foram significativamente maiores (p≤0,05) que os filmes obtidos por impregnação por scCO₂. O procedimento convencional (fundição), com a adição do óleo diretamente à SF, apresentou maior retenção de compostos antioxidantes nos filmes, sugerindo melhor incorporação de óleo com o uso do emulsificante, promovendo a miscibilidade do OE com o polímero, obtendo-se emulsões finas de OE no polímero na fase aquosa contínua, onde após a secagem dos filmes as gotículas de OE permaneceram incorporadas a matriz do filme.

Apesar de ter se observado aumento na atividade antioxidante dos filmes impregnado por scCO₂, com a adição de óleo, este foi bem menor do que nos filmes por fundição. Isso pode ter sido decorrente da retenção de óleo no fundo da célula (dados não mostrados), observado após o término do processo de impregnação, evidenciando que o teor de óleo usado no processo foi subutilizado, impactando de forma negativa na atividade antioxidante desses filmes.

Comportamento semelhante foi observado em estudos de Almeida et al. (2013) que testaram várias razões de massa para tentar aumentar a carga de óleo em partículas de amido e, conseqüentemente, sua atividade antioxidante, usando a impregnação por scCO₂. A atividade antioxidante teve aumento quase linear até um valor de razão de massa óleo/amido de 1,5, porém, acima desta razão não houve aumento e a eficiência/rendimento do processo foi considerada baixa com observação de retenção no fundo da célula.

Uma das vantagens da impregnação por CO₂ supercrítico é a possibilidade de recuperação do óleo não impregnado da corrente de saída de CO₂ e principalmente do fundo da célula, após a despressurização, podendo ser reaproveitado ao final do processo. Além de não

degradar o filme estudado. Além disso, o processo pode ser realizado em batelada ou fluxo contínuo dimensionadas para o tamanho industrial.

Em contrapartida, resultados satisfatórios com saturação do ativo no polímero foram observados nos estudos de Liu et al. (2020), que realizaram o carregamento de óleo em nanopartículas de sílica MCM-4. Os autores realizaram repetidas vezes o procedimento de impregnação por scCO₂ com o polímero, ou seja, repetidas vezes foi realizado a “injeção do óleo, imersão, carregamento do óleo em condição supercrítica e despressurização” para obter a carga máxima do óleo. O óleo foi carregado nas partículas de forma eficiente com uma alta carga de droga (> 40 % em peso). O carregamento parou quando o tempo do círculo passou de cinco ciclos, indicando que uma carga saturada de droga foi alcançada.

A baixa retenção de atividade antioxidante encontrada nos filmes por impregnação por scCO₂, pode ser proveniente da baixa solubilidade do óleo no scCO₂ nas condições operacionais estudadas, que podem ser superadas com o uso de cossolvente no processo. Garcías-Casas et al. (2019) estudaram o uso e a ausência de cossolvente no processo de impregnação de quercetina em sílica por scCO₂ e observaram aumento expressivo da quantidade do ativo no polímero com o uso de cossolvente (240 µg / g de sílica), em comparação ao processo sem o seu uso (10 µg / g de sílica) nas mesmas condições operacionais. Isso decorreu pela melhora da solubilidade e incorporação do ativo em scCO₂ com o uso de cossolvente.

O uso de cossolvente pode resultar em modificações na interação do ativo com a matriz porosa ou mesmo com o fluido pressurizado, alterando a taxa de impregnação. Os cossolventes, sendo água ou etanol (fluidos mais usados), podem contribuir significativamente para o aumento da eficiência do processo de impregnação, elevando a polaridade do fluido supercrítico e, assim, a solubilidade dos compostos mais polares, podendo haver também a melhora na impregnação de compostos hidrofóbicos contidos na matriz (BRAGA et al., 2011).

Assim, os dois filmes elaborados com 30% de OE produzidos por fundição (FG-Fundição 30%) e por impregnação por scCO₂ (FG-CO₂ 30%) foram selecionados para realização das análises posteriores, para manter a similaridade do percentual de óleo usado e avaliar os processos utilizados.

3.2 MEV

Todos os filmes apresentaram rugosidades em suas superfícies e pequenas rachaduras que podem ter sido produzidas pelo tratamento a vácuo aplicado nas amostras antes da MEV (ARAÚJO et al., 2018) (Figura 2). No entanto, esses danos físicos não foram observados nas amostras a olho nu.

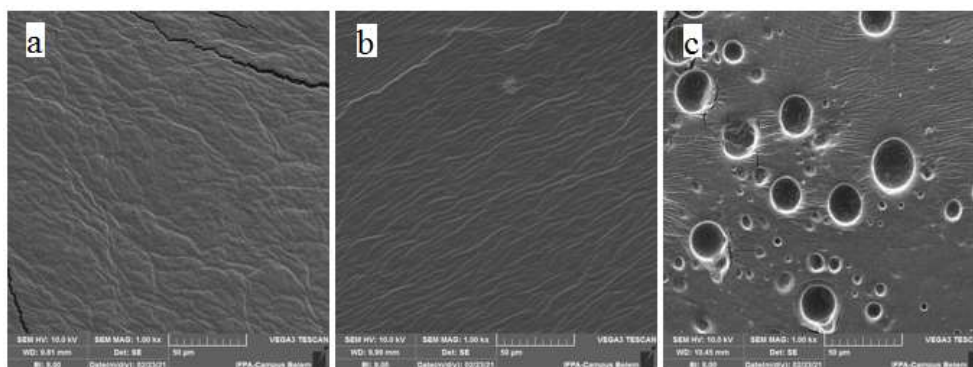


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de gelatina: a) FG-Controle, b) FG-Fundição 30% e C) FG-CO₂ 30%.

O FG-Controle (Fig. 2.a) exibiu uma estrutura homogênea e sem agregados. Superfície homogênea sem separação de fases também foi observada no FG-Fundição 30% (Fig. 2.b), indicando que a fixação do óleo com o emulsificante nas moléculas de gelatina não interferiu na organização estrutural destas moléculas na matriz do filme. O que pode ser devido ao pequeno tamanho e à distribuição uniforme das unidades de óleo ligadas covalentemente às cadeias de gelatina com o uso do emulsificante e a homogeneização da solução que mostrou ser eficiente a uma velocidade de 15.000 rpm. Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Scartazzini et al. (2019) que não observaram agregados de gota de óleo em filmes de gelatina.

A imagem da MEV do FG-CO₂ 30% (Fig. 2.c) mostrou distribuição heterogênea das gotículas de óleo como fase dispersa na matriz deste filme. Esse fenômeno pode ser atribuído à agregação de pequenas gotas ou pelo encapsulamento do óleo na matriz do filme durante a impregnação por scCO₂ (ALBUQUERQUE et al., 2020). Nos estudos de Souza et al. (2014) observaram mudanças na superfície do filme de amido após a impregnação por scCO₂ do cinnamaldeído, ocasionado pela deposição do composto durante a despressurização do processo. Na impregnação por scCO₂ de α -tocoferol em filmes de monocamada e multicamada e polietileno tereftalato (PET) / polipropileno (PP) a superfície do filme também foi modificada, tornando-se heterogênea (FRANCO et al., 2019).

Estudos realizados por Shen et al. (2021) usaram a técnica de encapsulamento de óleo com emulsões nano e pickering carregadas com óleo essencial de cravo em filmes de gelatina. Uma estrutura semelhante a uma bolha com protuberâncias causadas por gotículas da nanoemulsão e irregularidades e rugosidades na matriz do filme foram observadas. Esta tendência correspondeu ao aumento da agregação lipídica, que pode estar relacionado à passagem de material cumulativo ou glóbulos em direção à superfície do filme durante o processo de secagem e, por fim, levou a irregularidades e rugosidade na superfície do filme.

3.3 FTIR

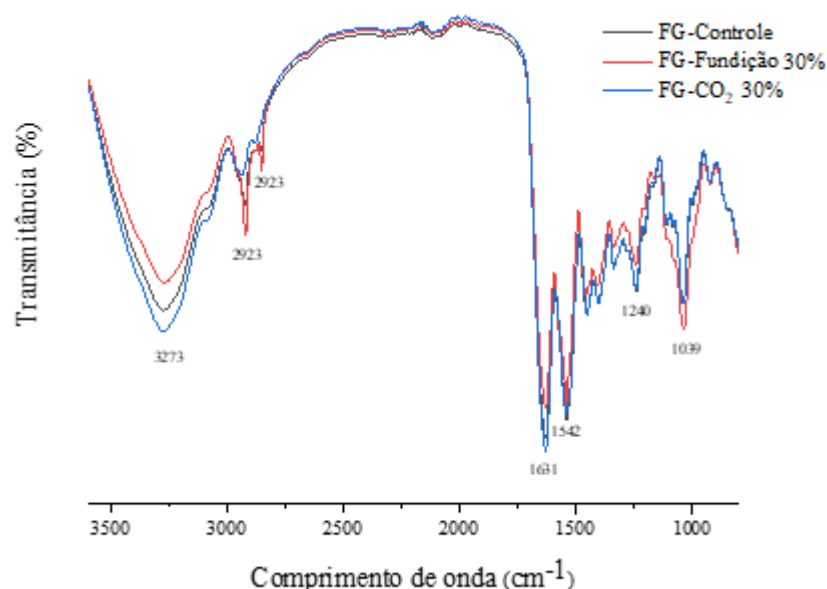


Figura 3. Espectros de FTIR dos filmes FG-Controle, FG-Fundição 30% e FG-CO₂ 30%.

Os picos principais em todos os espectros de FTIR dos filmes são semelhantes, exceto pelas diferenças nas amplitudes dos picos (Figura 3). Os filmes exibiram as bandas principais em 3273 cm⁻¹ (Amida-A, corresponde à vibração de alongamento de NH acoplado com a ligação de hidrogênio), 2923 cm⁻¹ (Amida-B, devido ao alongamento CH, CH ligado à dupla ligação, acoplado com alongamento NH), 1631 cm⁻¹ (Amida-I, ilustrou C=O estiramento/ ligação de hidrogênio acoplado com COO⁻), 1531 cm⁻¹ (Amida II, correspondente as vibrações de grupos N-H e vibrações de estiramento de grupos C-N), 1240 cm⁻¹ (Amida-III, ilustrando as vibrações no plano de grupos C – N e N – H de amida da proteína) (HOQUE et al., 2011).

A banda situada no número de onda de 1035-1039 cm⁻¹ foi devido às interações vibracionais decorrentes entre o plastificante (grupo OH do glicerol) e à matriz de gelatina.

Observou-se um leve deslocamento da banda do FG-Controle e FG-CO₂ 30% (1039 cm⁻¹) para o FG-Fundição 30% (1035 cm⁻¹) e maior amplitude neste pico. Esses resultados sugerem a maior presença de OH, provavelmente devido a adição da goma arábica nesse último filme, sugerindo interação vibracional entre a goma, o glicerol e a matriz do FG-Fundição 30%.

O número de onda em 3273 cm⁻¹, resultante do alongamento da amida A (-OH e / ou -NH₂) foi encontrado maior e mais amplo nos espectros dos filmes FG-CO₂ 30 % e FG-Controle em comparação com o filme FG-Fundição 30%. Esses resultados sugerem que o alargamento das bandas de OH e NH podem ser indicativos de maior interação vibracional de proteínas-proteínas nos filmes FG-CO₂ 30 % e FG-Controle, corroborando maior resistência mecânica encontrada nesses filmes.

A amplitude dos picos nos números de onda de 2923 cm⁻¹ e 2852 cm⁻¹ aumentou no FG-Fundição 30% em comparação aos outros filmes. Esses picos representam a vibração de estiramento assimétrico e simétrico de metileno do C-H alifático em grupos CH₂ e CH₃, respectivamente presentes na maioria dos lipídios e substâncias hidrofóbicas (GUILLÉN E CABO, 2004; MUIK et al., 2007). O resultado poderia ser uma sugestão indireta da maior hidrofobicidade/adição de óleo no filme elaborado por fundição, concomitante a maior IAA% apresentada por este filme. Resultados semelhantes com maior amplitude desses picos foram relatados em filmes incorporados com óleo (TONGNUANCHAN et al., 2012). Além disso, a composição química da goma arábica, presente no FG-Fundição 30%, consiste em pelo menos 3 fração de biopolímero de alto peso molecular, ou seja, arabinogalactano (80–90%), glicoproteína (2–4%) e arabinogalactano-proteína (10–20%) (MEHRNIA et al., 2017). A maior amplitude do pico em 2923 cm⁻¹ no espectro deste filme é característica do carboxil livre (SHADDEL et al., 2017).

Notou-se que as amplitudes da amida I, II e III dos FG-Controle e FG-CO₂ 30% foram ligeiramente superiores ao FG-Fundição 30%. Isto se deveu principalmente ao efeito de diluição encontrado nos filmes de gelatina incorporado pela maior quantidade de óleo essencial (TONGNUANCHAN et al., 2014).

3.4. PROPRIEDADES MECÂNICAS, ESPESSURA E SOLUBILIDADE

O FG-Controle e FG-CO₂ 30% mostraram maior ($p \leq 0,05$) resistência à tração quando comparado ao FG-Fundição 30% (Tabela 2). Com adição de óleo nos filmes, ocorreram

aumento do valor de E% e Espessura, ocasionados pelo efeito plastificante com consequente inchaço da matriz (GOÑI et al., 2016, TONGNUANCHAN et al., 2016; SILVA et al., 2021).

Observou-se que o FG-CO₂ 30% apresentou maior RT e menor espessura quando comparados ao FG-Fundição 30%. A resistência a tração está relacionada com a resistência a abrasão, amassamento ou outras injúrias mecânicas que alimentos podem sofrer durante o manuseio ou transporte; quanto maior for essa resistência mecânica do filme, mais resistente será a embalagem, o que contribui para extensão da vida útil de alimentos embalados, como frutas e hortaliças, pois os danos físicos não afetam somente a aparência dos alimentos, mas também o aroma e o sabor.

A redução das propriedades de tração pode ser atribuída à separação da rede de filme causada pela incorporação de OE entre cadeias de polímero, principalmente pela substituição parcial de interações polímero-polímero mais fortes por interações polímero-óleo mais fracas, modificando assim suas propriedades mecânicas (SHOJAEI-ALIABADI et al., 2013; MEDEIROS et al., 2017). Essa modificação foi mais pronunciada no FG-Fundição 30% proveniente da maior quantidade de OE presente, ratificando seu maior IAA%.

A variação da espessura do filme pode estar relacionada ao aumento do teor de sólidos ou devido às cadeias peptídicas na gelatina serem incapazes de formar uma rede de filmes compactos na presença de óleo (SCARTAZZINI et al., 2019; TONGNUANCHAN et al., 2015). Além disso, diferentes compostos químicos presentes no OE podem aumentar a distância espacial dentro da matriz do filme, o que leva a filmes mais espessos (HAGHIGHI et al., 2019)

O maior E% presente no FG-CO₂ 30% pode ser devido ao efeito plastificante do óleo e também ao CO₂ como consequência do tratamento supercrítico ocasionando mudanças nos domínios amorfo e cristalino na estrutura do filme. Essa melhora na resistência do filme à deformação por alongamento quando submetido à tração é um atributo importante para embalagens. Este comportamento favorável também foi relatado para outros materiais poliméricos incorporados com outros óleos (MEDEIROS et al., 2017; MOSQUERA et al., 2019).

Tabela 2. A resistência à tração (RT), % alongação (E%), espessura e solubilidade dos FG-Controle, FG-Fundição 30% e FG-CO₂ 30%.

Filmes	RT(KN)	E%	Espessura (mm)	Solubilidade
FG-Controle	11,73±2,98 ^a	34,10±2,78 ^b	0,08±0,005 ^c	25,59±1,64 ^b
FG-Fundição 30%	8,61±2,89 ^b	36,32±1,39 ^b	0,16±0,004 ^a	19,22±2,19 ^c
FG-CO ₂ 30%	10,02±1,19 ^a	49,67±6,89 ^a	0,11±0,01 ^b	44,83±1,40 ^a

* Média ± DP (n = 3). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (p≤0,05).

Observa-se também redução (p≤0,05) na solubilidade do FG-Fundição 30% comparada ao FG-Controle e FG-CO₂ 30%, este último apresentou aumento na solubilidade. Isso pode ser advinda da passagem do CO₂ e também a distribuição heterogênea do óleo presente no FG-CO₂ 30%, enfraquecendo negativamente sua resistência a água.

A menor solubilidade em água do FG-Fundição 30% provavelmente ocorreu devido ao aumento da hidrofobicidade pelo maior teor de óleo incorporado ao filme e à formação da interação entre componentes do OE e grupos hidroxila da matriz polimérica, com o uso do emulsificante. Este comportamento também foi relatado em outros filmes com óleo (AFTER et al., 2015; TONGNUANCHAN et al., 2016). Essa baixa solubilidade em água do FG-Fundição 30% é um importante atributo para aplicação em embalagens de alimentos com alta atividade de água (a_w), ou quando o filme deve estar em contato com a água e atuar como protetor de alimentos. A maior RT e E% do FG-CO₂ 30% são atributos importantes para garantir maior proteção a alimentos mais sujeitos a abusos mecânicos, choques e quedas.

3.5 COR, TRANSMISSÃO DE LUZ E TRANSPARÊNCIA DE FILMES

Tabela 3. Parâmetros de cor (L*, a*, b* e ΔE*) dos filmes FG-Controle, FG-CO₂ 30% e FG-Fundição 30%.

Filme	L*	a*	b*	ΔE*
FG-Controle	87,41±1,25 ^a	0,12±0,10 ^b	2,73±0,90 ^b	-
FG-Fundição 30%	85,48±0,98 ^a	0,26±0,04 ^b	9,63±1,50 ^a	9,73±1,49 ^a
FG-CO ₂ 30%	85,38±0,31 ^a	1,27±0,12 ^a	1,77±0,06 ^b	9,52±0,24 ^a

* Média ± DP (n = 3). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (p≤0,05).

Os resultados dos parâmetros (a* e b*) e ΔE* demonstram que a cor nos filmes foi afetada pela incorporação do óleo (Tabela 3). Apesar de não ter diferenças nos valores de L*

(Luminosidade) entres os filmes elaborados, é notável uma tendência decrescente com a incorporação de óleo (HAGHIGHI et al., 2019). O valor de a^* (verde-vermelho) aumentou ($p \leq 0,05$) em FG-CO₂ 30% quando comparado ao FG-Controle e FG-Fundição 30%. O valor b^* (azul-amarelo) no FG-Fundição 30% aumentou ($p \leq 0,05$) em relação aos outros filmes, apresentando ganho de uma leve cor amarela clara inerente do óleo. Esse resultado reforça a maior retenção de óleo no filme elaborado por fundição em comparação a impregnação por CO₂. Consequentemente, os resultados dos parâmetros ΔE^* não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) pela incorporação do OE entre as técnicas. O aumento do valor de b^* é relatado em outros trabalhos com a incorporação de diferentes óleos em filmes de gelatina ocasionando o amarelecimento (HAGHIGHI et al., 2019; SUN et al., 2021). No entanto, a cor dos filmes pode alterar a aparência geral do alimento dentro da embalagem e afetar a aceitação do cliente (ATARÉS E CHIRALT, 2016).

Pode-se observar que houve redução mais intensa das transmitâncias de luz com a incorporação do óleo pelo método de fundição quando comparado aos outros filmes elaborados (Tabela 4). O FG-Fundição 30% mostrou baixas transmitância indicando que apresenta excelentes propriedades de resistências a UV para aplicação em alimentos susceptíveis a luz.

Tabela 4. Transmissão de luz e transparência dos filmes FG-Controle, FG-CO₂ 30% e FG-Fundição 30%.

Filmes	Transmitância de luz (%) em diferentes comprimentos de onda (nm)								Valor de transparência
	200	280	350	400	500	600	700	800	
FG-Controle	0,0	0,3	27,8	39,8	50,1	56,3	59,9	62,6	1,69±0,01 ^c
FG-Fundição 30%	0,0	0,0	3,1	9,8	17,2	21,4	24,6	27,3	4,24±0,07 ^a
FG-CO ₂ 30%	0,0	0,1	29,7	39,5	47,4	52,6	56,3	58,8	1,86±0,06 ^b

* Média ± DP (n = 3). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

Adicionalmente, o valor de transparência do FG-Fundição 30% aumentou ($p \leq 0,05$) ao compará-lo com os outros filmes, apresentando diminuição da transparência ocasionada pela maior presença de óleo na matriz do filme de gelatina, sendo mais opaco. As propriedades ópticas dos materiais podem ser significativamente modificadas pela composição do óleo e podem modificar significativamente sua transparência (SCARTAZZINI et al., 2019). Este comportamento também foi observado em outros filmes de gelatina com óleo (TONGNUANCHAN et al., 2015; SUN et al., 2021). Em contrapartida, a maior transparência

observada no FG-CO₂ é atributo importante para não alterar a aparência do alimento embalado, facilitando sua visualização dentro da embalagem e garantindo maior confiabilidade pelo consumidor.

3.6. ATG

O comportamento da degradação térmica dos filmes FG-Controle, FG-Fundição 30% e FG-CO₂ 30% são mostrados nos termogramas de ATG na Figura 4. Os valores numéricos dos termogramas ATG são apresentados na Tabela 5.

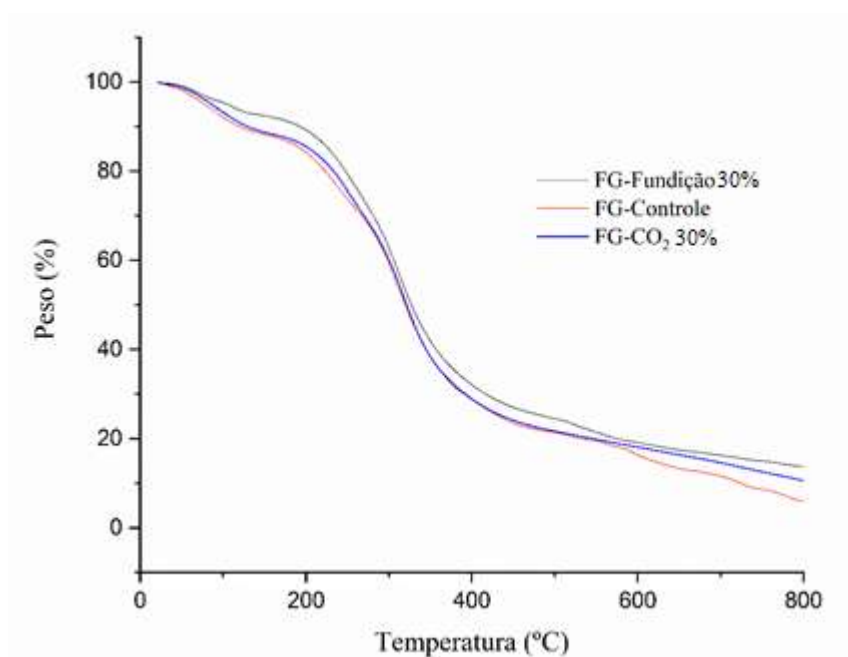


Figura 4. Curvas de ATG de filmes FG-Controle, FG-Fundição 30% e FG-CO₂ 30%.

O filme FG-Controle exibiu três grandes estágios de perda de peso, enquanto que os filmes FG-Fundição 30% e FG-CO₂ 30% apresentaram quatro estágios. O primeiro estágio de perda de peso foi associado com a perda de água livre, ligada e adsorvida presentes nos filmes (MAROUFI et al., 2021). No primeiro estágio o FG-CO₂ 30% teve maior perda de peso e maior temperatura de degradação do que os outros filmes, isto é, liberou maior quantidade de água da matriz.

Tabela 5. Temperaturas de degradação térmica (Td, °C) e perda de peso (Δw , %) de filmes FG-Controle, FG-Fundição 30% e FG-CO₂ 30%.

Amostra	$\Delta 1$		$\Delta 2$		$\Delta 3$		$\Delta 4$		Resíduo (%)
	Td1	$\Delta w1$	Td2	$\Delta w2$	Td3	$\Delta w3$	Td4	$\Delta w4$	
FG-Controle	48,36	11,79	199,21	16,74	285,50	49,70	-	-	21,77
FG-Fundição 30%	51,39	3,95	101,87	3,35	260,63	68,04	513,90	4,85	19,81
FG-CO ₂ 30%	65,92	12,01	214,79	18,40	296,76	46,16	462,17	12,81	10,62

$\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$ e $\Delta 4$ representam o primeiro, segundo, terceiro e quarto estágios de perda de peso, respectivamente, das amostras de filmes de gelatina durante a varredura de aquecimento (20-600 °C).

A perda de peso no segundo estágio foi associada principalmente a degradação da gelatina, o principal constituinte, e o glicerol usado como plastificante no filme (THEERAWITAYAART et al., 2019), ocasionando à destruição da rede polimérica (DENG et al., 2018). Foi claramente observada a maior temperatura de degradação e perda de peso presentes no FG-CO₂ 30% seguido do FG-Controle, resultado de redes de filmes mais densa e forte, ocasionado pela maior interação entre as moléculas de gelatina presentes na matriz desses filmes. Resultado que retifica a maior resistência mecânica desses filmes. A Td2 e $\Delta w2$ do FG-Fundição 30% foram menores, o que poderia estar relacionado à diferente estrutura da rede formada em função do conteúdo de óleo e emulsificante presente neste filme formado pelo processo de fundição.

Na terceira fase está relacionada com perda ou decomposição de proteínas de tamanho maior ou altamente interagidas e componentes estáveis em alta temperatura na matriz de filme (ARFAT et al., 2017), que está relacionada à decomposição química dos polímeros (AHAMMED et al., 2020). Foi notado a maior perda de massa no FG-Fundição 30%. A quarta fase da perda de peso foi observada apenas para filmes com óleo, provavelmente devido à perda de componentes que são estáveis em altas temperaturas (ALBUQUERQUE et al., 2020).

Os filmes FG-Fundição 30% e FG-Controle mostraram uma massa residual em torno de 20%, já o FG-CO₂ 30% apresentou massa residual em torno de 10%. Corrobora com a possível retenção de menor percentual de óleo adicionado a este filme e o enfraquecimento na rede da matriz do filme ocasionado pelo CO₂.

Os resultados sugeriram que o FG-CO₂ 30% mostrou a melhor estabilidade térmica, com menor resíduo, em comparação aos outros filmes. O que confirma a maior resistência mecânica encontrada neste filme. O FG-Fundição 30% apresentou a estabilidade térmica melhorada,

devido a maior retenção de óleo que poderia atuar como isolante térmico ou barreira de transporte de massa para os produtos voláteis gerados durante a decomposição. Isso resultou em atraso de degradação térmica e melhor estabilidade térmica dos compósitos. Além disso, demonstra a forte interação entre moléculas de gelatina, óleo e emulsificante quando se produz por técnica de fundição, produzindo uma rede de filmes mais forte, levando a resistência ao calor do filme resultante.

4 CONCLUSÃO

As técnicas de fundição e de impregnação por scCO₂ utilizadas para produzir filmes biodegradáveis de gelatina da pele de peixe com diferentes percentuais de óleo essencial *Piper divaricatum* foram satisfatórias para produzir filmes ativos com propriedades antioxidantes. A técnica de fundição apresentou maior potencial na produção de embalagens ativas, resultando em filmes com melhor atividade antioxidante, além de maior resistência a água e excelentes propriedades de proteção UV. Os filmes elaborados por impregnação por scCO₂ apresentou melhor resistência a tração e estabilidade térmica. A impregnação por scCO₂ se mostra como uma técnica viável para elaboração de embalagens ativas. Novos estudos devem ser realizados para aprimorar as limitações encontradas neste estudo, como o uso de cossolvente e reutilização do óleo não impregnado para aumentar a quantidade de óleo incorporado.

REFERÊNCIAS

- AFTER, M.; REZAEI, M.; BEHROOZ, R. (2015) Characterization of physical, mechanical, and antibacterial properties of agar-cellulose bionanocomposite films incorporated with savory essential oil. **Food Hydrocolloids**, 45: 150-157.
- AHAMMED, S.; LIU, F.; KHIN, M. N.; YOKOYAMA, W. H.; ZHONG, F. (2020) Improvement of the water resistance and ductility of gelatin film by zein. **Food Hydrocolloids**, 105: 105804.
- ALBUQUERQUE, G. A.; BEZERRA, F. W. F.; OLIVEIRA, M. S.; COSTA, V. A D.; CARVALHO JUNIOR, R. N.; JOELE, M. R. S. P. D. (2020) Supercritical CO₂ impregnation of *Piper divaricatum* essential oil in fish (*Cynoscion acoupa*) skin gelatin films. **Food and Bioprocess Technology**, 1765–1777.
- ALMEIDA, A. P.; RODRÍGUEZ-ROJO, S.; SERRA, A. T.; VILA-REAL, H.; SIMPLICIO,

- A. L.; DELGADILHO, I.; COSTA, S. B. DA; COSTA, L. B. DA; NOGUEIRA, I. D.; DUARTE, C. M. M. (2013) Microencapsulation of oregano essential oil in starch-based materials using supercritical fluid technology. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 20: 140–145.
- ARAÚJO, C. S.; RODRIGUES, A. M. C.; PEIXOTO JOELE, M. R. S.; ARAÚJO, E. A. F.; LOURENÇO, L. F. H. (2018) Optimizing process parameters to obtain a bioplastic using proteins from fish byproducts through the response surface methodology. **Food Packaging and Shelf Life**, 16: 23–30.
- ARFAT, Y. A.; AHMED, J.; HIREMATH, N.; AURAS, R.; JOSEPH, A. (2017) Thermo-mechanical, rheological, structural and antimicrobial properties of bionanocomposite films based on fish skin gelatin and silver-copper nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, 62: 191–202.
- ATARÉS, L.; CHIRALT A. (2016) Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. **Trends in Food Science and Technology**, 48: 51–62.
- BELIZÓN, M.; FERNÁNDEZ-PONCE, M. T.; CASAS, L.; MANTELL, C.; MARTÍNEZ DE LA OSSA-FERNÁNDEZ, E. J. (2018) Supercritical impregnation of antioxidant mango polyphenols into a multilayer PET/PP food-grade film. **Journal of CO₂ Utilization**, 25: 56–67.
- BEZERRA, F. W. F.; COSTA, W. A. D.; OLIVEIRA, M. S. D.; AGUIAR ANDRADE, E. H. D.; CARVALHO, R. N. D. (2018) Transesterification of palm pressed-fibers (*Elaeis guineensis* Jacq.) oil by supercritical fluid carbon dioxide with entrainer ethanol. **Journal of Supercritical Fluids**, 136: 136–143.
- BRAGA, M. E. M.; COSTA, V. P.; PEREIRA, M. J. T.; FIADEIRO, P. T.; GOMES, A. P. A. R.; DUARTE, C. M. M.; SOUSA, H.C. (2011) Effects of operational conditions on the supercritical solvent impregnation of acetazolamide in Balafilcon A commercial contact lenses. **International Journal of Pharmaceutics**, 420: 231–243.
- CEJUDO BASTANTE, C.; CRAN, M. J.; CARDOSO, L. C.; SERRANO, C. M.; DE, E. J. M.; BIGGER, S. W. (2019) Effect of supercritical CO₂ and olive leaf extract on the structural, thermal and mechanical properties of an impregnated food packaging film. **The Journal of Supercritical Fluids**, 145: 181–191.
- DENG, L.; ZHANG, X.; LI, Y.; QUE, F.; KANG, X.; LIU, Y.; et al. (2018) Characterization of gelatin/zein nanofibers by hybrid electrospinning. **Food Hydrocolloids**, 75: 72–80.
- FRANCO, P.; INCARNATO, L.; MARCO, I. D. (2019) Supercritical CO₂ impregnation of α -

tocopherol into PET/PP films for active packaging applications. **Journal of CO₂ Utilization**, 34: 266–273.

GARCÍA-CASAS, I.; CRAMPON, C.; MONTES, A.; PEREYRA, C.; MARTINEZ DE LA OSSA, E. J.; BADENS, E. (2019) Supercritical CO₂ impregnation of silica microparticles with quercetin. **The Journal of Supercritical Fluids**, 143: 157–161.

GÓMEZ-ESTACA, J.; BRAVO, L.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; ALEMÁN, A.; MONTERO, P. (2009) Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. **Food Chemistry**, 112(1): 18–25.

GOÑI, M. L.; GAÑÁN, N. A.; BARBOSA, S. E.; STRUMIA, M. C.; MARTINI, R. E. (2017) CO₂ -assisted impregnation of LDPE / sepiolite nanocomposite films with insecticidal terpene ketones: Impregnation yield, crystallinity and mechanical properties assessment. **The Journal of Supercritical Fluids**, 130: 337–346.

GOÑI, M. L.; GAÑÁN, N. A.; STRUMIA, M. C.; MARTINI, R. E. (2016) Eugenol-loaded LLDPE films with antioxidant activity by supercritical carbon dioxide impregnation. **The Journal of Supercritical Fluids**, 111: 28–35.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J.; GUILBERT, S. (1994) Edible composite films of wheat gluten and lipids - water-vapor permeability and other physical-properties. **International Journal of Food Science and Technology**, 29(1): 39–50.

GUILLÉN, M. D.; CABO, N. (2004) Study of the effects of smoke flavourings on the oxidative stability of the lipids of pork adipose tissue by means of Fourier transform infrared spectroscopy. **Meat Science**, 66(3): 647–657.

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

HAGHIGHI, H.; BIARD, S.; BIGI, F.; DE LEO, R.; BEDIN, E.; PFEIFER, F.; SIESLER, H. W.; LICCIARDELLO, F.; PULVIRENTI, A. (2019) Comprehensive characterization of active chitosan-gelatin blend films enriched with different essential oils. **Food Hydrocolloids**, 95: 33 – 42.

JAHED, E.; KHALEDABAD, M.A.; ALMASI, H.; HASANZADEH, R. (2017) Physicochemical properties of Carum copticum essential oil loaded chitosan films containing organic nanoreinforcements. **Carbohydrate Polymers**, 164: 325-338.

- LIU, X.; JIA, J.; DUAN, S.; ZHOU, X.; XIANG, A.; LIAN, Z.; GE, F. (2020) Zein/MCM-41 nanocomposite film incorporated with cinnamon essential oil loaded by modified supercritical CO₂ impregnation for long-term antibacterial packaging. **Pharmaceutics**, 12: 169.
- KAVOOSI, G.; BORDBAR, Z.; DADFAR, S. M.; DADFAR, S. M. M. (2017) Preparation and characterization of a novel gelatin–poly(vinyl alcohol)hydrogel film loaded with *Zataria multiflora* essential oil for antibacterial–antioxidant wound-dressing applications. **Journal Applied Polymer Science**, 134(39): 45351.
- MARKOVIĆ, D.; MILOVANOVIĆ, S.; CLERCK, K. D.; ZIZOVIC, I.; STOJANOVIĆ, D.; RADETIĆ, M. (2018) Development of material with strong antimicrobial activity by high pressure CO₂ impregnation of polyamide nanofibers with thymol. **Journal of CO₂ Utilization**, 26: 19–27.
- MAROUFI, L. Y.; GHORBANI, M.; TABIBIAZAR, M.; MOHAMMADI, M.; PEZESHKI, A. (2021) Advanced properties of gelatin film by incorporating modified kappa-carrageenan and zein nanoparticles for active food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, 183: 753–759.
- MEDEIROS, E. F.; AFONSO, M. S.; SANTOS, M. A. Z. D.; BENTO, F. M.; QUADRO, M. S.; ANDREAZZA, R. (2019) Physicochemical characterization of oil extraction from fishing waste for biofuel production. **Renewable Energy**, 143, 471-477.
- MEDEIROS, G. R.; FERREIRA, S. R. S.; CARCIO, B. A. M. (2017) High pressure carbon dioxide for impregnation of clove essential oil in LLDPE films. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 41: 206–215.
- MEHRNIA, M. A.; JAFARI, S. M.; MAKHMAL-ZADEH B. S.; MAGHSOUDLOU, Y. (2017) Rheological and release properties of double nano-emulsions containing crocin prepared with Angum gum, Arabic gum and whey protein. **Food Hydrocolloids**, 66: 259-267.
- MILOVANOVIĆ, S.; HOLLERMANN, G.; ERRENST, C.; PAJNIK, J.; FRERICH, S.; KROLL, S.; REZWAN, K.; IVANOVIC, J. (2018) Supercritical CO₂ impregnation of PLA/PCL films with natural substances for bacterial growth control in food packaging. **Food Research International**, 107: 486-495.
- MOSQUERA, J. E.; GOÑI, M. L.; MARTINI, R. E.; GAÑÁN, N. A. (2019) Supercritical carbon dioxide assisted impregnation of eugenol into polyamide fibers for application as a dental floss. **Journal of CO₂ Utilization**, 32: 259–268.

- MUIK, B.; LENDL, B.; MOLINA-DIAZ, A.; VALCARCEL, M.; AYORA-CAÑADA, M. J. (2007) Two-dimensional correlation spectroscopy and multivariate curve resolution for the study of lipid oxidation in edible oils monitored by FTIR and FT-Raman spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, 593(1): 54–67.
- OLIVEIRA, M. S. D.; CRUZ, J. N. D.; SILVA, S. G.; COSTA, W. A. D.; SOUSA, S. H. B. D.; BEZERRA, F. W. F.; et al. (2019) Phytochemical profile, antioxidant activity, inhibition of acetylcholinesterase and interaction mechanism of the major components of the *Piper divaricatum* essential oil obtained by supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, 145: 74–84.
- SCARTAZZINI, L.; TOSATI, J. V.; CORTEZ, D. H. C.; ROSSI, M. J.; FLÔRES, S. H.; HUBINGER, M. D.; DI LUCCIO, M.; MONTEIRO, A. R. (2019) Gelatin edible coatings with mint essential oil (*Mentha arvensis*): film characterization and antifungal properties. **Journal of Food Science and Technology**, 56(9): 4045–4056.
- SHEN, Y.; NI, Z. J.; THAKUR, K.; ZHANG, J. G.; HU, F.; WEI, Z. J. (2021) Preparation and characterization of clove essential oil loaded nanoemulsion and pickering emulsion activated pullulan-gelatin based edible film. **International Journal of Biological Macromolecules**, 181: 528–539.
- SILVA, J. K. R. D.; ANDRADE, E. H. A.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J. G. S. (2010) Essential Oil Composition, Antioxidant Capacity and Antifungal Activity of *Piper divaricatum*. **NPC Natural Product Communications**, 5(3): 477 – 480.
- SILVA, N. D. S.; FARIAS, F. S.; FREITAS, M. M. D. S.; HERNÁNDEZ, E. J. G. P.; DANTAS, V. V.; OLIVEIRA, M. E. C.; JOELE, M. R. S. P.; LOURENÇO, L. F. H. (2021) Artificial intelligence application for classification and selection of fish gelatin packaging film produced with incorporation of palm oil and plant essential oils. **Food Packaging and Shelf Life**, 27: 100611.
- SILVA, N. D. S.; HERNÁNDEZ, E. J. G. P.; ARAÚJO, C. D. S. A.; JOELE, M. R. S. P.; LOURENÇO, L. D. F. H. (2018) Development and optimization of biodegradable fish gelatin composite film added with buriti oil. **CYTA - Journal of Food**, 16(1): 340–349.
- SHADDEL, R.; HESARI, J.; AZADMARD-DAMIRCHI, S.; HAMISHEHKAR, H.; FATHI-ACHACHLOUEI, B.; HUANG, Q. (2017) Use of gelatin and gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation. **International Journal of Biological**

Macromolecules, 107: 140-145.

SHOJAEI-ALIABADI, S.; HOSSEINI, H.; MOHAMMADIFAR, M. A.; MOHAMMADI, A.; GHASEMLOU, M.; OJAGH, S. M. et al. (2013) Characterization of antioxidant-antimicrobial κ -carageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, 52: 116 – 124.

SUDERMAN, N.; SARBON, N. M. (2020) Optimization of chicken skin gelatin film production with different glycerol concentrations by response surface methodology (RSM) approach. **Journal of Food Science and Technology**, 57(2): 463–472.

SUN, X.; WANG, J.; ZHANG, H.; DONG, M.; LI, L.; JIA, P.; BU, T.; WANG, X.; WANG, L. (2021) Development of functional gelatin-based composite films incorporating oil-in-water lavender essential oil nano-emulsions: Effects on physicochemical properties and cherry tomatoes preservation. **LWT - Food Science and Technology**, 142: 110987.

THEERAWITAYAART, W.; PRODPRAN, T.; BENJAKUL, S. (2019) Properties of films from fish gelatin prepared by molecular modification and direct addition of oxidized linoleic acid. **Food Hydrocolloids**, 88: 291–300.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. (2012) Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. **Food Chemistry**, 134(3): 1571–1579.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. (2014) Structural, morphological and thermal behaviour characterisations of fish gelatin film incorporated with basil and citronella essential oils as affected by surfactants. **Food Hydrocolloids**, 41: 33–43.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. (2016) Mechanical, thermal and heat sealing properties of fish skin gelatin film containing palm oil and basil essential oil with different surfactants. **Food Hydrocolloids**, 56, 93–107.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; NILSUWAN, K. (2015) Emulsion film based on fish skin gelatin and palm oil: Physical, structural and thermal properties. **Food Hydrocolloids**, 48: 248–259.

VILHENA, C. S.; NASCIMENTO, L. A. S. DO; ANDRADE, E. H. DE A.; SILVA, J. K. R. DA; HAMOY, M.; TORRES, M. F.; BARBAS, L. A. L. (2019) Essential oil of *Piper divaricatum* induces a general anaesthesia-like state and loss of skeletal muscle tonus in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, 510: 169–175.

WU, J.; SUN, X.; GUO, X.; GE, S.; ZHANG, Q. (2017) Physicochemical properties, antimicrobial activity and oil release of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil. **Aquaculture and Fisheries**, 2(4): 185-192.

CONCLUSÃO GERAL

A impregnação por CO₂ supercrítico apresentou potencial para produção de filmes biodegradáveis de gelatina da pele de peixe com óleo essencial *Piper divaricatum* com propriedades antioxidantes. Novos estudos devem ser realizados para aprimorar as limitações encontradas neste estudo, como o uso de cossolvente e/ou reutilização do óleo não impregnado para aumentar a quantidade de óleo incorporado. A técnica de fundição apresentou maior potencial na produção destas embalagens ativas com melhor retenção de atividade antioxidante.