



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

EVELINE MARIA SILVEIRA NUNES

EFEITO DO REVESTIMENTO DE QUITOSANA NA VIDA ÚTIL DE
FILÉS DE PARGO (*Lutjanus purpureus*) ARMAZENADOS SOB
CONGELAMENTO

FORTALEZA

2014

EVELINE MARIA SILVEIRA NUNES

EFEITO DO REVESTIMENTO DE QUITOSANA NA VIDA ÚTIL DE FILÉS DE PARGO
(*Lutjanus purpureus*) ARMAZENADOS SOB CONGELAMENTO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dra. Elisabeth Mary Cunha da Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Bartolomeu Warlane Silva de Souza

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- N924e Nunes, Eveline Maria Silveira.
Efeito do revestimento de quitosana na vida útil de filés de pargo (*Lutjanus purpureus*) armazenados sob congelamento / Eveline Maria Silveira Nunes. – 2014.
69 f. : il., color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Tecnologia do Pescado.
Orientação: Profa. PhD Elisabeth Mary Cunha da Silva.
Coorientação: Prof. Dr. Bartolomeu Warlane Silva de Souza.
1. *Lutjanus purpureus*. 2. Quitosana. 3. Refrigeração. I. Título.

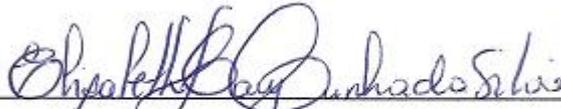
EVELINE MARIA SILVEIRA NUNES

EFEITO DO REVESTIMENTO DE QUITOSANA NA VIDA ÚTIL DE FILÉS DE PARGO
(*Lutjanus purpureus*) ARMAZENADOS SOB CONGELAMENTO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: 30/07/2014.

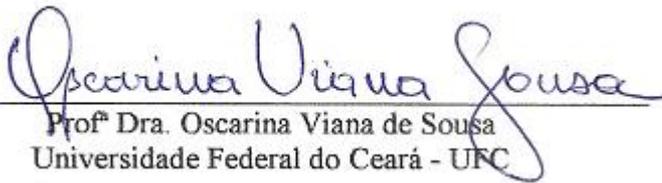
BANCA EXAMINADORA



Profª Dra. Elisabeth Mary Cunha da Silva (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof. Dr. Bartolomeu Warlane Silva de Souza (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC



Profª Dra. Oscarina Viana de Sousa
Universidade Federal do Ceará - UFC



Profª Dra. Maria Lúcia Nunes
Universidade Federal do Ceará - UFC



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

À Deus.

À minha mãe, Terezinha.

RESUMO

A preferência dos consumidores por alimentos minimamente processados e de qualidade tem levado ao desenvolvimento de filmes e revestimentos que sirvam como uma barreira de proteção aos alimentos. Uma vez que peixes contêm gordura oxidável, a aplicação de revestimentos antioxidantes para esses produtos pode ser benéfica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do revestimento de quitosana na extensão da vida útil de filés de Pargo (*Lutjanus purpureus*), considerando-se as condições microbiológicas e físico-químicas e compará-lo com o método tradicional de glaciamento. Utilizaram-se filés de pargo *Lutjanus purpureus* adquiridos *in natura* que foram imediatamente congelados em laboratório. Após o congelamento um grupo de amostras foi glaciado (Tratamento I), outro grupo foi revestido com quitosana (Tratamento II) e o outro foi usado sem tratamento (Controle). Após os tratamentos, cada filé foi embalado individualmente em sacos de polietileno e armazenados a temperatura de $-18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 180 dias. As análises microbiológicas e físico-químicas foram realizadas a cada 30 dias. Com exceção das *Pseudomonas* spp. e das bactérias Estafilococos coagulase positiva, o revestimento de quitosana não surtiu efeito bacteriostático ou bactericida nos demais micro-organismos estudados. No que se referem às análises físico-químicas notou-se que durante os 180 dias de estocagem, os valores de BVT não apresentaram grandes alterações enquanto os de TMA aumentaram significativamente no último dia de armazenamento para todos os grupos. Os valores de pH aumentaram significativamente apenas no grupo Controle enquanto os valores de TBARS indicaram que tanto o revestimento de quitosana como o glaciamento inibiu a oxidação lipídica nos filés de peixe durante a estocagem. As análises de cor indicaram que as amostras tratadas com ambos os revestimentos sofreram alterações menores tanto da pele quanto do músculo, em relação ao Controle, provavelmente devido à proteção conferida por essas camadas. Com relação à textura, observou-se uma discreta diminuição da resistência ao corte das amostras em todos os grupos, no entanto esses valores não foram estatisticamente diferentes. Conclui-se que o revestimento de quitosana contribuiu para evitar a oxidação lipídica e alterações de cor na pele e no músculo do pescado, mantendo o pH e ainda observou-se um efeito benéfico desse revestimento na sua qualidade microbiológica, contribuindo portanto, para estender a vida útil dos filés de pargo congelados.

Palavras-chave: Pargo (*Lutjanus purpureus*). Revestimento de quitosana. Glaciamento. Congelamento. Oxidação lipídica.

ABSTRACT

Consumers' preference for minimally processed foods and their demand for quality have led to the development of films and coatings serving as a protective barrier to food. Since fish contain oxidizable fat, application of these coatings for product antioxidants may be beneficial. This work was evaluate the effectiveness of chitosan coating on shelf-life extension of fillets of snapper (*Lutjanus purpureus*), considering the microbiological and physico-chemical conditions and compare it with the traditional method of glazing. Fillets of snapper (*Lutjanus purpureus*) were obtained fresh and immediately frozen in the laboratory. After freezing a group of samples was water glazed (Treatment I), another group received chitosan coating (Treatment II) and the other received no treatment (Control). Following treatments, each fillet was individually packaged in polyethylene bags and subjected to frozen storage at a temperature of $-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 180 days. Microbiological and physicochemical analyzes were performed every 30 days. Apart from *Pseudomonas* spp. and coagulase positive staphylococci bacteria, chitosan coating did not show any bactericidal or bacteriostatic effect on other microorganisms studied. In relation to the physicochemical quality analysis it was observed that during the 180 days of storage, the values of BVT showed no major changes. On the other hand, the TMA values increased significantly in the last days of storage for all groups. The pH values increased significantly only in the control group over the period of frozen storage while the TBARS values indicated that either chitosan coating or water glazing clearly inhibited lipid oxidation in fish fillets during storage. The color analyses indicated that the samples treated with both coatings showed minor changes on both skin and muscle, compared to the control, probably due to the protection provided by these layers. Regarding to texture analyses, there was a slight reduction of the shear force of the samples in all groups; however these values were not statistically different. It is concluded that the chitosan coating helped to prevent lipid oxidation and color changes in the skin and muscle of fish, maintaining the pH, and yet there was a beneficial effect of this coating on its microbiological quality thus, contributing to extend the shelf life of frozen red snapper fillets.

Keywords: Snapper (*Lutjanus purpureus*). Chitosan coating. Glazing. Freezing. Lipid oxidation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Contagem de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC) nos filés de pargo (<i>Lutjanus purpureus</i>) dos três grupos armazenados a -18 °C por 180 dias	38
Figura 2 - Quantificação de <i>Pseudomonas</i> spp. dos filés de pargo (<i>Lutjanus purpureus</i>) dos três grupos armazenados a -18 °C por 180 dias	40
Figura 3 - Quantificação de Estafilococos coagulase positivas dos filés de pargo (<i>Lutjanus purpureus</i>) dos três grupos armazenados a -18 °C por 180 dias.....	41
Figura 4 - Teores de TBARS das amostras de filé de pargo (<i>Lutjanus purpureus</i>) dos três grupos armazenados a -18 °C por 180 dias.....	49
Figura 5 - pH das amostras de filés de pargo (<i>Lutjanus purpureus</i>) dos três grupos armazenados a -18 °C por 180 dias.....	52
Figura 6 - Componentes L* da cor do músculo de filés de pargo (<i>Lutjanus purpureus</i>) dos três grupos armazenados a -18 °C por 180 dias.....	54
Figura 7 - Componente a* da cor do músculo de filés de pargo (<i>Lutjanus purpureus</i>) dos três grupos armazenados a -18 °C por 180 dias.....	55
Figura 8 - Componente b* da cor do músculo de filés de pargo (<i>Lutjanus purpureus</i>) dos três grupos armazenados a -18 °C por 180 dias.....	56
Figura 9 - Componente L* da cor da pele de filés de pargo (<i>Lutjanus purpureus</i>) dos três grupos armazenados a -18 °C por 180 dias.....	57
Figura 10 - Componente a* da cor da pele de filés de pargo (<i>Lutjanus purpureus</i>) dos três grupos armazenados a -18 °C por 180 dias.....	58
Figura 11 - Componente b* da cor da pele de filés de pargo (<i>Lutjanus purpureus</i>) dos três grupos armazenados a -18 °C por 180 dias.....	59
Figura 12 - Alteração visível da cor da pele dos filés de pargo (<i>Lutjanus purpureus</i>) a partir do 90° dia.....	60
Figura 13 - Textura instrumental de filés de pargo (<i>Lutjanus purpureus</i>) dos três grupos armazenados a -18 °C por 180 dias.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Correspondência entre os nomes vulgar e científico para as categorias de pescado do gênero <i>Lutjanus</i>	14
Tabela 2 - Valores de bases voláteis totais (mg de N-BVT/100 g) de filés de pargo (<i>Lutjanus purpureus</i>) dos três grupos armazenados a -18 °C por 180 dias.....	44
Tabela 3 - Valores de trimetilamina (mg de N-TMA/100 g) de filés de pargo (<i>Lutjanus purpureus</i>) dos três grupos armazenados a -18 °C por 180 dias.....	47
Tabela 4 - Composição centesimal de filé de pargo com 1 e 180 dias de armazenamento.	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	Lutjanídeos	13
2.2	Armazenamento congelado	15
2.3	Micro-organismos importantes na deterioração do pescado	17
2.4	Filmes e revestimentos de alimentos	20
2.5	Biopolímeros usados na fabricação de filmes e revestimentos	22
2.6	Aplicação de filmes e revestimentos em pescados	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Tratamentos das amostras	29
3.2	Análises microbiológicas	30
3.2.1	Processamento e diluição das amostras	30
3.2.2	Contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC)	30
3.2.3	Contagem de <i>Vibrio</i>	30
3.2.4	Quantificação de <i>Estafilococos</i> coagulase positiva	31
3.2.5	Pesquisa de <i>Salmonella</i>	31
3.2.6	Análise de <i>Pseudomonas</i>	31
3.3	Análises físico-químicas	31
3.3.1	Bases voláteis totais (BVT)	31
3.3.2	Trimetilamina (TMA)	32
3.3.3	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	33
3.3.4	pH	34
3.3.5	Cor	34
3.3.6	Textura instrumental (Força de cisalhamento)	34
3.3.7	Composição centesimal	34
3.3.7.1	Cinzas	35
3.3.7.2	Umidade	35
3.3.7.3	Lipídios	35
3.3.7.4	Proteína	36
3.4	Análises estatísticas	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Análises microbiológicas	38

4.2	Análises físico-químicas	43
4.2.1	Bases voláteis totais (BVT)	43
4.2.2	Trimetilamina (TMA)	46
4.2.3	TBARS	48
4.2.4	pH	51
4.2.5	Cor	53
4.2.5.1	Cor do músculo	53
4.2.5.2	Cor da pele	56
4.2.6	Textura instrumental	60
4.2.7	Composição centesimal	61
5	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o crescente aumento da demanda dos consumidores por produtos de pesca tem levado a um controle maior na qualidade e segurança desses alimentos (LOUKAS *et al.*, 2010). Os peixes apresentam uma boa qualidade nutricional de seus lipídios, por meio da presença significativa de ácidos graxos das séries w-3 e w-6, além de níveis baixos de colesterol, fatores estes, que têm estimulado o consumo de peixes tanto de água doce como salgada (VILA NOVA, GODOY, ALDRIGUE, 2005).

O pargo, *Lutjanus purpureus*, está entre as categorias de pescado mais valiosas no mercado brasileiro. A cor vermelha de sua pele exerce uma forte atratividade perante os consumidores. No entanto, do ponto de vista tecnológico, tem-se observado que, desde a sua captura até a obtenção do filé congelado, ocorrem transformações que são responsáveis pela diminuição da intensidade da coloração vermelha da sua pele. Dessa forma, existe uma preocupação na indústria de pescados, haja vista que a perda de cor da pele faz com que haja uma queda no preço do produto (LE MOS, 1984; RESENDE, FERREIRA, FREDOU, 2003; VILA NOVA, GODOY, ALDRIGUE, 2005; TIMÓTEO, 2007).

Aliado a isso, a preferência por alimentos minimamente processados, contendo menos conservantes e aditivos sintéticos, mas mantendo-se a qualidade sensorial, tem levado à realização de pesquisas e desenvolvimento de filmes e revestimentos. Dessa forma, tem-se notado uma tendência no uso de filmes e revestimentos biodegradáveis baseados em biopolímeros de fontes renováveis, tornando-se um importante fator na redução do impacto ambiental das embalagens tradicionais (GIALAMAS *et al.*, 2010; PEREDA *et al.*, 2011; NÚÑES-FLORES *et al.*, 2012).

Os filmes e revestimentos podem ser considerados tanto embalagens como um componente do alimento, devendo cumprir requisitos, tais como: boa qualidade sensorial, biocompatibilidade, alta eficiência de barreira e mecânica, estabilidade bioquímica e físico-química, segurança microbiológica, atóxico, de natureza não poluente e baixo custo (VÁSCONEZ *et al.*, 2009; PEREDA *et al.*, 2011).

Os materiais mais comumente utilizados para a produção dos filmes e revestimentos são os biopolímeros, como carboidratos. Esses compostos são, muitas vezes, produtos desperdiçados da agricultura, pecuária e pesca. Entre os biopolímeros, a quitosana está sendo um dos mais estudados devido à capacidade de formar filme e a utilidade como um filme/revestimento exterior para proteger o alimento da desidratação e exposição à luz e ao

oxigênio (GÓMEZ-ESTACA *et al.*, 2010; PEREDA *et al.*, 2011; NÚÑES-FLORES *et al.*, 2012; ABDOLLAHI, REZAEI, FARZI, 2012).

A quitosana é o biopolímero de carboidratos mais abundante na natureza e promissor e é obtido pela desacetilação da quitina, o maior componente das carapaças de crustáceos, como caranguejo, camarão e lagosta (VÁSCONEZ *et al.*, 2009; PEREDA *et al.*, 2011; KANATT *et al.*, 2012). Ela tem potencial para ser usada como um recurso alternativo das embalagens ativas de alimentos, tendo propriedades antioxidantes e antimicrobianas intrínsecas, que são afetadas pelo grau de desacetilação, peso molecular, concentração, pH do meio, temperatura e outros componentes (SIRIPATRAWAN, HARTE, 2010).

A quitosana apresenta uma inibição eficaz tanto no crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas, como também de leveduras e bolores, e por isso, tem sido bastante utilizada como filme e revestimento antimicrobianos (SIRIPATRAWAN, HARTE, 2010). Devido ao seu caráter catiônico, a quitosana tem o potencial de se ligar a diferentes componentes do alimento, tais como alginatos, pectinas, proteínas, polieletrólitos inorgânicos, tais como polifosfato e espécies de íons carregados positivamente, através de interações doador/receptor. Em matrizes alimentares complexas, a particularidade acima mencionada pode diminuir o efeito antimicrobiano da quitosana (AIDER, 2010).

Os revestimentos, por eles mesmos ou agindo como transportadores de aditivos alimentares, como antioxidantes e antimicrobianos, têm sido particularmente considerados na preservação de alimentos devido à habilidade de estender a vida útil desses produtos (VÁSCONEZ *et al.*, 2009; GIALAMAS *et al.*, 2010). No entanto, uma vez que as propriedades antimicrobianas da quitosana dependem significativamente dos nutrientes do alimento, a eficácia da matriz deve ser verificada especificamente para cada produto (FERNANDEZ-SAIZ *et al.*, 2010).

Dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do revestimento de quitosana na extensão da vida útil de filés de Pargo (*Lutjanus purpureus*), considerando-se as condições microbiológicas e físico-químicas e compará-lo com o método tradicional de congelamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lutjanídeos

Espécies de peixes demersais da família *Lutjanidae* vêm sendo exploradas pela pesca comercial na costa norte/nordeste do Brasil, desde a introdução das linhas pargueiras pelos portugueses, durante os anos de 1950 e 1960, com o propósito de diversificar as pescarias de atum e lagosta que já se encontravam em declínio. As espécies do grupo estão entre as categorias de pescado mais valiosas no mercado, sendo consideradas como peixe de primeira qualidade em todos os estados (RESENDE, FERREIRA, FREDOU, 2003).

O pescado é de extrema importância na dieta alimentar por sua riqueza de nutrientes, alto teor proteico, lipídios de excelente qualidade e baixo teor de colesterol. Um peixe pertencente ao grupo dos Lutjanídeos que é bastante apreciado na cozinha nordestina é o pargo (*Lutjanus purpureus*) que possui grande importância comercial, embora suas características nutricionais sejam pouco estudadas. É um peixe demersal, de cor vermelha, sendo encontrado no Atlântico Ocidental desde o sul do Caribe até o litoral paulista (VILA NOVA, GODOY, ALDRIGUE, 2005).

A estatística oficial dos desembarques controlados no nordeste registra as capturas de Lutjanídeos, e também mostra a alta diversidade da comunidade de peixes demersais tropicais, a exemplo da categoria “pargo”, que nos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Pernambuco é composto de cinco espécies, sendo elas: *Lutjanus purpureus*, *Lutjanus vivanus*, *Lutjanus bucanella*, *Etelis oculatus* e *Rhomboplites aurorubens*. A Tabela 1 apresenta a correspondência entre as categorias e seus respectivos nomes científicos (RESENDE, FERREIRA, FREDOU, 2003).

No Ceará e no Rio Grande do Norte a categoria “pargo” foi considerada como um recurso pesqueiro importante com altas produções até 1990. A partir desse ano as capturas passaram a decrescer (RESENDE, FERREIRA, FREDOU, 2003). Dentre os Lutjanídeos mais representativos nas capturas de 2010, no contexto nacional, destacam-se a guaiúba (4.945 t), o pargo (6.199 t), o ariacó (1.933 t), a cioba (2.087 t) e o dentão (943 t) (BRASIL, 2012).

O Pargo é um peixe teleósteo marinho, que se alimenta principalmente de crustáceos, peixes e moluscos. Tipicamente bentopelágico, apresenta ampla e conhecida distribuição geográfica, incluindo a costa leste e oeste do Oceano Atlântico, Mar Mediterrâneo e ao norte das Ilhas Britânicas. De ocorrência muito comum na costa sudeste-sul do Brasil, o pargo tem uma importância comercial bastante significativa, sendo pescado

comercialmente entre o Espírito Santo e o Rio Grande do Sul, servindo ao mercado interno e à exportação (SAAD, LUQUE, 2009).

Tabela 1 - Correspondência entre os nomes vulgar e científico para as categorias de pescado do gênero *Lutjanus*.

Nome	
Vulgar	Científico
Ariacó	<i>Lutjanus synagris</i>
Carapitanga	<i>Lutjanus apodus</i>
Baúna	<i>Lutjanus griséus</i>
Caranha	<i>Lutjanus cyanopterus</i>
Cioba	<i>Lutjanus analis</i>
Dentão	<i>Lutjanus jocu</i>
Guaiúba	<i>Lutjanus chrysurus</i>
Pargo-verdadeiro	<i>Lutjanus purpureus</i>
Pargo-olho-de-vidro	<i>Lutjanus vivanus</i>
Pargo-boca-negra	<i>Lutjanus bucanella</i>

FONTE: RESENDE, FERREIRA, FREDOU, 2003.

A existência da coloração natural do pargo condiciona uma boa aceitação ou não pelos consumidores, bem como o seu preço no mercado. Em geral, essa pigmentação é influenciada pela estimulação hormonal, cor do fundo dos tanques e pela iluminação. Por outro lado, quando submetidos ao estresse, os peixes reagem negativamente influenciando a sua coloração, a qual se torna mais escura (TIMÓTEO, 2007).

A aceitação do pargo decorrente da atrativa coloração vermelha da sua pele justifica a industrialização deste produto pesqueiro. No entanto, do ponto de vista tecnológico, tem-se observado que, desde a captura do pargo até a obtenção do filé congelado, ocorrem transformações que são responsáveis pela diminuição da intensidade da coloração vermelha da sua pele. Dessa forma, existe uma preocupação na indústria de pescados com respeito à exportação deste produto, haja vista que a perda de cor da pele do pargo faz com que haja uma queda no preço do produto (LEMOS, 1984).

O aumento da demanda por produtos de pesca, bem como a estagnação das reservas mundiais de populações de peixes, em que muitas foram prejudicadas devido à pesca excessiva, levou as indústrias de pescado a investirem na aquicultura. O pargo é uma espécie que satisfaz alguns dos critérios estabelecidos para a seleção de peixes destinados a

aquicultura intensiva, como: o alto valor de mercado e demanda, a elevada taxa de crescimento, a adaptabilidade a altas densidades, resultando em rápida disponibilidade para o mercado com menor custo (LOUKAS *et al.*, 2010).

A qualidade da sua carne faz do pargo uma das espécies de maior interesse comercial, estando regulado pelas condições de estoque. No entanto, por ser um alimento altamente perecível, exige cuidados em sua captura, manipulação, transporte e distribuição, estando sujeito à contaminação por vários micro-organismos adquiridos no próprio ambiente aquático ou em uma das etapas citadas. Esses micro-organismos podem influenciar no prazo de vida comercial do pescado, já reduzido em função da composição biológica e atividade enzimática, acarretando um tempo restrito de comercialização e distribuição, principalmente quando transportado a longas distâncias. Além disso, essa contaminação também pode resultar em problemas econômico ou relacionados à saúde do consumidor (SALGADO *et al.*, 2006; TIMÓTEO, 2007; GÓMEZ-ESTACA *et al.*, 2010).

2.2 Armazenamento congelado

Sabe-se que a perda de frescor e o padrão de deterioração do peixe variam significativamente entre as espécies. Assim que o peixe morre várias mudanças ocorrem. Essas mudanças são devido ao colapso da estrutura celular e bioquímica, bem como ao crescimento de micro-organismos que estão naturalmente associados com o peixe ou que se tornam parte da microbiota por causa da contaminação durante a manipulação. Dentro dessas mudanças que afetam direta e fortemente a qualidade e vida útil do peixe, estão a degradação proteica, a degradação do ATP, a queda do pH, a oxidação lipídica, a produção de compostos indesejáveis como a trimetilamina (TMA-N) e as bases voláteis de baixo peso molecular (TVB-N), que são produzidas pela ação bacteriana. Também o músculo sofre alterações na textura, capacidade de retenção de água e cor (OCAÑO-HIGUERA *et al.*, 2009).

A deterioração do peixe segue normalmente quatro estágios: rigor mortis, resolução do rigor, autólise (perda do frescor) e deterioração microbiana. Esses estágios acontecem rápida ou lentamente dependendo da espécie, condição fisiológica do peixe, contaminação microbiana e temperatura. O processo autolítico é realizado por enzimas endógenas presentes no músculo, enquanto a deterioração é causada pelo crescimento microbiano. Tem-se observado que as condições de captura, manipulação e processamento determinam essas mudanças, sendo a temperatura o fator de maior impacto. Portanto, para preservar o frescor e a qualidade inicial do músculo é importante que, após a captura do

animal, a temperatura seja diminuída o mais rápido possível (OCAÑO-HIGUERA *et al.*, 2009).

Uma das maiores preocupações da indústria de pescado é melhorar as tecnologias de conservação dos alimentos perecíveis para conseguir um produto final com ótima qualidade. Entre os vários métodos atualmente utilizados, os mais importantes são aqueles baseados no uso de baixas temperaturas (GONÇALVES, GINDRI JUNIOR, 2009). É crescente a importância de peixes congelados, acompanhando a crescente demanda do consumidor por pescado. O sucesso desse método de processamento pode ser explicado pela sua eficácia no que diz respeito à conservação de produtos altamente perecíveis (VANHAECKE, VERBEKE, BRABANDER, 2010).

O armazenamento congelado é um método eficiente de preservação de pescado, mas a qualidade final do produto depende de sua qualidade no momento do congelamento, como também de outros fatores durante o congelamento, o armazenamento congelado e a distribuição. Esse método pode proporcionar uma vida útil de mais de um ano se corretamente executado (GONÇALVES, GINDRI JUNIOR, 2009).

No entanto, durante o armazenamento congelado, o pescado pode sofrer desidratação ou secagem em sua superfície, podendo resultar em queima pelo frio e perda de peso, podendo conduzir a degradação de sua qualidade devido ao ranço ou à oxidação (VANHAECKE, VERBEKE, BRABANDER, 2010). Esses processos são proporcionais à área de superfície exposta e pode ser reduzida cobrindo-se essa superfície com um material de embalagem ou envolvendo o produto com uma fina camada de gelo (GONÇALVES, GINDRI JUNIOR, 2009).

A tecnologia acima mencionada, geralmente aplicada durante o armazenamento de pescado congelado, consiste na aplicação de uma camada de gelo na superfície do produto congelado, criando um revestimento, por pulverização ou imersão do produto em água e é referida como glaciamento (VANHAECKE, VERBEKE, BRABANDER, 2010, SOARES, MENDES, VICENTE, 2013). Logo que o produto congela, deve sofrer o glaciamento e, imediatamente, ser transferido para armazenamento à baixa temperatura para rapidamente recongelar e preservar o sabor, odor e textura, bem como minimizar as perdas por gotejamento pelo degelo (GONÇALVES, GINDRI JUNIOR, 2009).

Durante o armazenamento congelado de alguns peixes, as mudanças na qualidade são causadas pela oxidação, desnaturação proteica, sublimação e recristalização dos cristais de gelo. Isso pode resultar em *off-flavors*, rancidez, desidratação, perda de peso, perda de suculência, perda por gotejamento e endurecimento, bem como deterioração microbiana e

autólise (GONÇALVES, GINDRI JUNIOR, 2009). Na indústria pesqueira, o glaciamento é uma tecnologia amplamente utilizada para proteger o peixe congelado durante a conservação (SOARES, MENDES, VICENTE, 2013).

O glaciamento desses produtos normalmente impede a ocorrência dessas alterações durante o armazenamento congelado, uma vez que a camada de gelo exclui o ar da superfície do produto e, dessa forma, reduz a taxa de oxidação. Além disso, ele retarda a queima pelo frio, uma vez que o revestimento de água formado sublima em vez da água do tecido (SOARES, MENDES, VICENTE, 2013). A camada de gelo é tipicamente aplicada de 4 % a 12 % do peso líquido, dependendo do produto. Em casos extremos, camadas de gelo de até 25 % - 40 % são utilizadas (VANHAECKE, VERBEKE, BRABANDER, 2010).

A quantidade da camada de gelo aplicada depende de vários fatores, como: o tempo de glaciamento, a temperatura do produto, a temperatura da água, o tamanho e a forma do produto (GONÇALVES, GINDRI JUNIOR, 2009). A determinação do conteúdo da camada de gelo em filés de peixe é muito relevante. Primeiramente, o grau de glaciamento afeta a qualidade do produto oferecido, um baixo grau de glaciamento (< 6 %) pode prejudicar a função protetora. Depois, um glaciamento excessivo (> 12 %) pode implicar em lucros adicionais para os vendedores, ocasionando uma fraude comercial, que pode levar a conflitos nas relações de consumo, uma vez que o consumidor sente-se enganado ao comprar gelo por pescado (VANHAECKE, VERBEKE, BRABANDER, 2010).

Embora o glaciamento seja um método efetivo de conservação de alimentos, alguma deterioração na qualidade de produtos glaciados ocorre durante o armazenamento congelado. O grau da perda de qualidade depende de muitos fatores, inclusive da taxa de congelamento e descongelamento, da temperatura de armazenamento, das flutuações de temperatura, do congelamento-descongelamento abusivo durante o armazenamento, transporte, exposição à venda e consumo (GONÇALVES, GINDRI JUNIOR, 2009).

2.3 Micro-organismos importantes na deterioração do pescado

A deterioração microbiana de alimentos pode ocorrer de diversas formas, mas todas elas são consequências do crescimento e/ou da atividade microbiana, que se manifesta com mudanças nas características sensoriais como a produção de odores e sabores estranhos, a formação de limo, a formação de colônias visíveis, a produção de gás e a descoloração. Os peixes frescos são inicialmente contaminados por uma ampla variedade de micro-organismos,

mas somente uma seleção desses contaminantes é capaz de colonizar o alimento e crescer a números elevados (GRAM, HUSS, 1996).

Essa contaminação natural depende, entre outros fatores, do meio ambiente, da temperatura da água, da área de captura e da manipulação e processamento (BROEKAERT *et al.*, 2011). No entanto, não é o número total da microbiota do peixe responsável pela sua deterioração, mas apenas uma pequena fração dessa microbiota conhecida como "organismos de deterioração específicos" (ODE). Tem sido relatado que, primariamente, *Pseudomonas* e, secundariamente, *Shewanella* são os ODEs de pargos refrigerados (BROEKAERT *et al.*, 2011; PARLAPANI *et al.*, 2013).

Pescado é mais perecível que carne de frango e carne vermelha, como também apresenta o conteúdo de aminoácidos livres e bases voláteis nitrogenadas relativamente alto quando comparado com outras carnes. O alto conteúdo de compostos nitrogenados de baixo peso molecular, pH neutro e alta atividade de água nesses produtos os tornam extremamente sensíveis à microbiota deteriorante. Esses micro-organismos podem deteriorar produtos à base de peixe fresco armazenados em contato com o ar, embalados a vácuo ou em atmosfera modificada (VÁSCONEZ *et al.*, 2009; CHAHAD *et al.*, 2012).

Existem vários fatores intrínsecos específicos no peixe que influenciam muito a microbiota e os deteriorantes. Os peixes são organismos cuja temperatura interna varia consideravelmente, permitindo a presença de bactérias que crescem a uma ampla faixa de temperatura. Os peixes de águas tropicais geralmente contem uma carga ligeiramente maior de Gram-positivos e de bactérias entéricas (GRAM, HUSS, 1996). Os peixes de água fria e os de água temperada contêm principalmente psicrótróficos Gram-negativos, micro-organismos aeróbios estritos ou anaeróbios facultativos como *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Moraxella/Acinetobacter*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, ou a família *Vibrionaceae* (BROEKAERT *et al.*, 2011).

Outro fator intrínseco é o pH *post-mortem* elevado (> 6,0). Isso traz consequências importantes para a microbiota do peixe, pois permite o crescimento de bactérias deteriorantes sensíveis ao pH como *Shewanella putrefaciens*. A fração de nitrogênio não proteico (NNP) presente na carne do peixe, como aminoácidos livres e nucleotídeos, funciona como substrato prontamente disponível para o crescimento microbiano. Óxido de trimetilamina (OTMA), parte dos NNPs, está presente em todos os peixes marinhos e alguns de água doce. Um número bem definido de bactérias deteriorantes (*Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrionaceae*) é capaz de utilizar OTMA como aceptor

terminal de elétrons na respiração anaeróbica resultando em odores e sabores estranhos devido à formação de trimetilamina (TMA) (GRAM, HUSS, 1996).

Pescado fresco e aquele minimamente processado são alguns dos produtos alimentícios mais perecíveis durante o armazenamento devido a reações químicas e enzimáticas e sua rápida deterioração microbiana. A principal causa desta última é a atividade de micro-organismos deteriorantes típicos de pescado, sendo *Pseudomonas fluorescences* um dos mais relevantes quando o produto está embalado aerobiamente (ITURRIAGA, OLABARRIETA, MARAÑÓN, 2012).

A deterioração microbiana de peixe de água salgada é causada por bactérias Gram-negativas não fermentadoras pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Alteromonas* e *Shewanella* (CHOULIARA *et al.*, 2004). A deterioração do peixe embalado aerobicamente consiste tipicamente de bastonetes psicrotóxicos Gram-negativos não fermentadores. Assim, em armazenamento aeróbico congelado, a microbiota é composta quase que exclusivamente de *Pseudomonas* sp. e *Shewanella putrefaciens*. Esta é uma bactéria deteriorante específica de peixes marinhos de água temperada, embalados aerobicamente e armazenados congelados. *Pseudomonas* sp. são deteriorantes específicos de peixes de água doce tropical armazenados congelados e são também, junto com *S. putrefaciens*, deteriorantes de peixes marinhos tropicais armazenados congelados (GRAM, HUSS, 1996).

Quando embalado aerobicamente, níveis de $10^8 - 10^9$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de bactérias deteriorantes específicas por grama são requeridas para causar deterioração no peixe congelado. Já a deterioração de peixes refrigerados e embalados anaerobicamente é visto a um nível muito mais baixo de 10^7 *P. phosphoreum* por grama de peixe. Esse nível relativamente baixo de células é devido ao grande tamanho da bactéria, resultando em uma grande quantidade de TMA por célula e, então, uma elevada atividade deteriorante. Calculando a quantidade de TMA por superfície ou volume da célula, a produção de TMA pela *P. phosphoreum* não difere da *S. putrefaciens*, por exemplo (GRAM, HUSS, 1996).

Photobacterium phosphoreum é uma bactéria marinha pertencente à família *Vibrionaceae* que não cresce quando colocada em placa e incubada a altas temperaturas. Ela é facilmente isolada do intestino de vários peixes. Esse micro-organismo produz 10 – 100 vezes mais TMA por célula que o *S. putrefaciens*, mas não causa odores indesejáveis, provavelmente porque não produz sulfetos voláteis (GRAM, HUSS, 1996). *P. phosphoreum*

tem sido identificada como uma ODE responsável pela produção de TMA e deterioração de bacalhau embalado em atmosfera modificada (MACÉ *et al.*, 2012).

Por outro lado, o pescado também é vulnerável a bactérias patogênicas transmitidas por alimentos, como *Listeria monocytogenes* e *Aeromonas hydrophila*, que são capazes de crescer em temperaturas de refrigeração (ITURRIAGA, OLABARRIETA, MARAÑÓN, 2012).

2.4 Filmes e revestimentos de alimentos

A carne de peixe contém ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa com uma grande variedade de benefícios à saúde. No entanto, esses ácidos graxos são altamente susceptíveis a sofrerem reações de oxidação, que é outro mecanismo importante que leva à deterioração do pescado. A oxidação dos lipídios no pescado leva à redução da vida útil devido a mudanças no sabor, odor, degradação da textura e redução da qualidade nutricional (ABREU *et al.*, 2010).

Assim, antioxidantes são adicionados aos alimentos para retardar o início ou desacelerar a taxa de oxidação do produto. No entanto, os antioxidantes sintéticos usados podem trazer riscos à saúde de seres humanos por serem potencialmente carcinogênicos. Além disso, também tem sido levada em consideração a migração de materiais de embalagem para o alimento, que não é desprezível, e pode, ainda, aproximar-se da quantidade de aditivos usados diretamente nos produtos (ABREU *et al.*, 2010).

A embalagem é um importante insumo na indústria de alimentos e é dominada por polímeros derivados do petróleo. Diante do exposto e do desejo da sociedade por alimentos com menos aditivos sintéticos e por produtos que causem menos impacto ao ambiente, pesquisas estão sendo feitas para o desenvolvimento de novos materiais de embalagem biodegradável a partir de polímeros naturais a fim de alcançar uma alternativa parcial à embalagem plástica (GÓMEZ-ESTACA *et al.*, 2010; KANATT *et al.*, 2012). Isso também levou ao desenvolvimento de embalagens ativas, que é uma embalagem inovadora que realiza algumas funções na preservação do alimento (SIRIPATRAWAN, HARTE, 2010).

As embalagens de alimentos são tradicionalmente usadas para possibilitar a comercialização dos produtos e melhorar a proteção passiva contra agentes ambientais que afetam sua vida útil. A embalagem ativa, em vez da embalagem tradicional que é requerida para ser totalmente inerte, é projetada para interagir ativamente com o conteúdo e/ou com o meio circundante (ABREU *et al.*, 2011). Ainda, as embalagens ativas com propriedades

antioxidantes têm recebido atenção especial, uma vez que elas são uma das alternativas mais promissoras para as embalagens tradicionais (LÓPEZ-DE-DICASTILLO *et al.*, 2012).

A tecnologia de embalagem antimicrobiana, um conceito inovador, pode ser definida como uma versão da embalagem ativa na qual a embalagem, o produto e o ambiente interagem para estender a fase de latência e/ou reduzir a taxa de crescimento de microorganismos. Com esta ação, a vida útil do produto é prolongada, e sua qualidade e segurança são melhores preservadas (SUPPAKUL *et al.*, 2003; KUORWEL *et al.*, 2013).

Embalagem antimicrobiana é uma das formas mais promissoras de sistemas de embalagens ativas que objetiva a proteção de produtos alimentícios da contaminação microbiana. As funções adicionais de preservação, dadas pelo sistema de embalagem ativa, o diferencia dos sistemas tradicionais de embalagem que oferecem apenas proteção contra influências externas (KUORWEL *et al.*, 2013).

Pesquisas na aplicação de novos métodos de preservação estão sendo necessárias, não somente para melhorar a extensão da vida útil do produto, como também para preservar sua segurança microbiológica (ITURRIAGA, OLABARRIETA, MARAÑÓN, 2012). Com isso, a política de gestão ambiental tem incentivado a pesquisa e o desenvolvimento de filmes e revestimentos comestíveis (GÓMEZ-ESTACA *et al.*, 2010; PEREDA *et al.*, 2011).

A aplicação de películas e revestimentos antioxidantes nos peixes pode ser benéfica, uma vez que esses produtos contêm gorduras oxidáveis. O nível de oxidação de lípidos em produtos de peixe é frequentemente avaliado medindo substâncias como as que são reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), expressas como conteúdo de malonaldeído (BONILLA *et al.*, 2012).

Filmes e revestimentos podem ser preparados a partir de proteínas, carboidratos ou misturas com lipídios, que são em muitos casos produtos desperdiçados da agroindústria (GÓMEZ-ESTACA *et al.*, 2010). Esses hidrocolóides devem ter boa capacidade de formar filmes transparentes, incolores, inodoros e insípidos (ITURRIAGA, OLABARRIETA, MARAÑÓN, 2012).

As vantagens dessas coberturas são a comestibilidade, biocompatibilidade, aparência estética, propriedades de barreira, sendo não tóxicos, não poluentes e tendo baixo custo. Além disso, filmes e revestimentos com atividade antioxidante e antimicrobiana intrínseca ou agindo como transportadores de aditivos alimentares têm sido particularmente considerados na preservação de alimentos devido à habilidade de estender a vida útil (VÁSCONEZ *et al.*, 2009; GIALAMAS *et al.*, 2010).

Filmes e revestimentos de base biológica têm sido investigados por suas habilidades a fim de evitar a perda de umidade ou a absorção de água pela matriz do alimento, a penetração do oxigênio, a perda de aromas e o transporte de solutos (HOSSEINI *et al.*, 2013). Tais invólucros hidrofílicos apresentam uma barreira ao oxigênio e ao dióxido de carbono e propriedades mecânicas adequadas em baixa umidade relativa (KILINCCEKER, DOGAN, KUCUKONER, 2009).

Os envoltórios produzidos a partir de proteínas e carboidratos são excelentes barreiras ao oxigênio, por causa da sua rígida estrutura de rede devido às ligações de hidrogênio. A permeabilidade ao oxigênio de materiais comestíveis depende de muitos fatores, tais como a temperatura e a umidade relativa. Com o aumento da umidade relativa, mais moléculas de água interagem com o material e a película se torna mais plastificada. Nestas condições, a extensa mobilidade e transferência de massa em todo o filme são favorecidos. Por esta razão, a capacidade antioxidante dos filmes e revestimentos deve sempre ser testada sob condições controladas de umidade relativa (BONILLA *et al.*, 2012).

2.5 Biopolímeros usados na fabricação de filmes e revestimentos

Os biopolímeros têm sido amplamente investigados ao longo das duas últimas décadas para a eliminação dos resíduos de materiais de embalagens plásticas de alimentos. Os filmes e revestimentos de biopolímeros, além de serem materiais biodegradáveis, podem também melhorar a qualidade do alimento e estender a vida útil por minimizar o crescimento microbiano no produto (ABDOLLAHI, REZAEI, FARZI, 2012). Adicionalmente, esses polímeros naturais oferecem uma grande possibilidade de suplementar o valor nutricional dos alimentos, enquanto sua biodegradabilidade e compatibilidade ambiental são asseguradas (PEREDA *et al.*, 2011).

Filmes e revestimentos à base de amido têm sido particularmente considerados por exibirem características físicas similares aos polímeros sintéticos, como transparência, odor, sabor, semipermeabilidade ao CO₂ e resistência à passagem de O₂. Estudos confirmaram que filmes e revestimentos à base de amido incorporados com conservantes têm estendido a vida útil de vegetais frescos e minimamente processados (VÁSCONEZ *et al.*, 2009).

Entre os biopolímeros, as proteínas também têm sido extensivamente utilizadas para o desenvolvimento de películas biodegradáveis, devido à sua abundância e a boa capacidade de formação de filme. As proteínas são heteropolímeros contendo uma variedade

de aminoácidos, que podem sofrer uma gama de interações e reações químicas (TONGNUANCHAN, BENJAKUL, PRODPRAN, 2012).

A gelatina é uma proteína animal que pode ser obtida por hidrólise controlada das fibras insolúveis de colágeno, presentes nos ossos e peles gerados como resíduo no abate animal e processamento. A gelatina pode formar filmes e revestimentos em baixa umidade relativa com boas propriedades ópticas, propriedades mecânicas adequadas e excelente propriedade de barreira a gases, luz e oxigênio e proteção contra desidratação. A composição de filmes e revestimentos com quitosana e gelatina tem sido usada para melhorar as propriedades mecânicas, de transporte e físicas quando comparada com filmes formados apenas com um componente (GENNADIOS, 2002; PEREDA *et al.*, 2011; NÚÑEZ-FLORES *et al.*, 2012).

Já entre os carboidratos, a quitosana tem atraído uma crescente atenção, uma vez que seus filmes e revestimentos são reconhecidos por melhorarem a qualidade e a vida útil dos alimentos protegidos. A quitosana tem várias propriedades funcionais que a fazem técnica e fisiologicamente útil na nutrição. Tecnicamente, temos sua atividade antimicrobiana, sua habilidade em formar filmes protetores, sua propriedade texturizante e sua atividade antioxidante (GÓMEZ-ESTACA *et al.*, 2010; PEREDA *et al.*, 2011).

A quitosana, um desacetilado derivado da quitina, é o segundo polissacarídeo mais abundante encontrado na natureza depois da celulose, sendo um dos biopolímeros mais promissor. Ela é produzida com diferentes graus de desacetilação e pesos moleculares. Esse biopolímero traz algumas vantagens em relação a outros polímeros à base de biomoléculas ativas usados como materiais de embalagem, devido à sua inerente propriedade antimicrobiana e habilidade quelante de minerais bivalentes (VÁSCONEZ *et al.*, 2009; FERNANDEZ-SAIZ, 2010; PEREDA *et al.*, 2011; ABDOLLAHI, REZAEI, FARZI, 2012).

Com isso, a quitosana tem se revelado útil para várias aplicações, como quelação de metais no tratamento de águas residuais, purificação da água, clarificação e desacidificação de sucos de frutas, formação de filmes biodegradáveis e preservação de alimentos da deterioração microbiana. No entanto, a atividade antimicrobiana da quitosana depende de vários fatores como o grau de desacetilação, peso molecular, pH do meio, temperatura e outros componentes. Além disso, sua fraca propriedade mecânica e de barreira a gás, e a fraca resistência à água limitam sua aplicação particularmente na presença de água e umidade (VÁSCONEZ *et al.*, 2009; FERNANDEZ-SAIZ, 2010; PEREDA *et al.*, 2011; ABDOLLAHI, REZAEI, FARZI, 2012).

A quitosana é um componente não tóxico, biodegradável, biofuncional e biocompatível, e a capacidade formadora de filme permite sua aplicação diretamente como um revestimento de materiais de embalagem sem a necessidade de uma matriz transportadora. Além disso, a quitosana tem a habilidade de absorver nutrientes usados pelas bactérias e, também, a capacidade de se vincular à água e inibir vários sistemas enzimáticos bacterianos. Em relação à sua aplicação em alimentos, a eficácia desse componente contra seus microorganismos deteriorantes, pesquisada nos últimos anos, visa assegurar o uso da quitosana como um conservante natural quando aplicado como revestimento comestível (YE, NEETOO, CHEN, 2008; GÓMEZ-ESTACA *et al.*, 2010; FERNANDEZ-SAIZ, 2010; ABDOLLAHI, REZAEI, FARZI, 2012). No entanto, filmes baseados em biopolímeros são, em geral, altamente sensíveis às condições ambientais e geralmente apresentam baixa resistência mecânica (KANATT *et al.*, 2012).

Quanto ao modo de ação dos filmes e revestimentos de quitosana, o efeito biocida está relacionado à liberação de frações de glucosamina protonadas do biopolímero no meio. Uma vez que a presença de água é um fator indispensável para a liberação das cadeias de glucosamina e, portanto, para o desempenho antimicrobiano de filmes à base de quitosana, o peixe poderia ser um produto alimentar alvo muito adequado devido ao seu alto teor de água (FERNANDEZ-SAIZ *et al.*, 2013).

Embora a quitosana tenha propriedades reconhecidas para ser aplicada em alimentos como filmes e revestimentos, ela tem também alguns inconvenientes que restringem seu uso devido ao seu inerente caráter hidrofílico. Dessa forma, filmes e revestimentos formados de quitosana são frágeis e não tem boas propriedades mecânicas (YE, NEETOO, CHEN, 2008). Uma técnica promissora para superar essas limitações é através da mistura e laminação dos biopolímeros (PEREDA *et al.*, 2011).

Muitas outras estratégias também têm sido desenvolvidas para melhorar as propriedades de barreira e mecânica de filmes e revestimentos biodegradáveis à base de quitosana, como a adição de plastificantes e sal, modificação química de grupos hidroxila, ligações cruzadas de polissacarídeos, o uso de solvente adequado, a mudança do pH, a adição de diferentes polissacarídeos e a mistura com outros polímeros (ABDOLLAHI, REZAEI, FARZI, 2012).

2.6 Aplicação de filmes e revestimentos em pescado

Pescado atrai grande atenção por parte dos consumidores como uma fonte de componentes nutricionais importantes para uma dieta saudável, sendo o peixe uma fonte relevante de proteínas de alta qualidade. O peixe é muito conhecido por sua riqueza de nutrientes como proteínas, vitaminas D e E, selênio e os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, como o ômega-3. Nas últimas décadas, o consumo deste grupo de alimentos aumentou e tornou-se disponível para os consumidores que residem longe das áreas costeiras (SOARES, MENDES, VICENTE, 2013).

No entanto, o peixe cru é um alimento altamente perecível, devido a fatores intrínsecos, como sua elevada atividade de água, valor de pH neutro, enzimas autolíticas, baixo teor de tecido conjuntivo, carga microbiana natural e considerável quantidade de aminoácidos livres e de bases nitrogenadas voláteis (KILINCCEKER, DOGAN, KUCUKONER, 2009, DUAN *et al.*, 2010, RODRIGUEZ-TURIENZO *et al.*, 2011). Dentre os alimentos frescos, o pescado é certamente o mais difícil de preservar (FERNANDEZ-SAIZ *et al.*, 2013).

A deterioração dos peixes é provocada por reações biológicas, tais como a oxidação de lipídios, reações devido à atividade de enzimas endógenas, como também pelas atividades metabólicas dos micro-organismos. Estas atividades levam a uma vida útil curta em peixes e outros pescados (OJAGH *et al.*, 2010, ELSABEE, ABDU, 2013, QIU *et al.*, 2014). A refrigeração e o congelamento são os métodos de conservação de peixes mais comumente utilizados, mas eles não inibem completamente a deterioração da qualidade do peixe (DUAN *et al.*, 2010).

Durante o armazenamento refrigerado, estes alimentos são muito susceptíveis à deterioração principalmente devido ao rápido crescimento microbiano próprio ou de contaminação. Isso pode resultar em problemas de qualidade e/ou de segurança e, portanto, associada a problemas em termos económicos e de saúde (FERNANDEZ-SAIZ *et al.*, 2013).

A deterioração do músculo de peixes ocorre principalmente nas porções contendo gorduras. Esses ácidos graxos são afetados pelo oxigênio ambiental que oxida e estraga a carne de peixes (KILINCCEKER, DOGAN, KUCUKONER, 2009). Então, algumas medidas são necessárias para atrasar o declínio da qualidade do pescado e estender a vida útil dos peixes através da inibição ou retardamento do crescimento de micro-organismos e redução da taxa de oxidação lipídica (SONG *et al.*, 2011).

A crescente demanda por alta qualidade de pescado fresco tem intensificado a busca de novos métodos e tecnologias para melhor preservar os peixes (ELSABEE, ABDU, 2013). Assim, o aperfeiçoamento das técnicas de conservação de alimentos, a fim de levar peixe com segurança para os consumidores e manter suas características sensoriais é uma grande preocupação da indústria de pescado (SOARES, MENDES, VICENTE, 2013).

A fim de evitar a degradação do pescado, são utilizados diferentes métodos de conservação, dentre eles, o congelamento é um método que permite uma vida útil prolongada com pequenas alterações na qualidade do peixe, caso certas precauções sejam tomadas. O congelamento pode diminuir a atividade enzimática e é um método eficaz de conservação de alimentos contra a deterioração microbiana, bem como preserva o sabor e o valor nutricional. Temperaturas de armazenamento mais frias do que $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ são capazes de inibir o crescimento microbiano (GONÇALVES, GINDRI JUNIOR, 2009, RODRIGUEZ-TURIENZO *et al.*, 2011, RODRIGUEZ-TURIENZO, COBOS, DIAZ., 2012).

No entanto, outras alterações indesejáveis, tais como a oxidação de lipídios, perda de peso, a desnaturação das proteínas, queima e desidratação da superfície, ainda podem ocorrer durante o armazenamento congelado prolongado. Além de oxidação lipídica, a degradação da cor e a perda de umidade são fatores importantes na determinação da qualidade sensorial e nutricional do peixe congelado e, eventualmente, influenciam a aceitabilidade do produto, afetando negativamente a qualidade nutricional e sensorial de pescado congelado. (RODRIGUEZ-TURIENZO *et al.*, 2011, RODRIGUEZ-TURIENZO, COBOS, DIAZ, 2012, SOARES, MENDES, VICENTE, 2013).

Nesse sentido, o glaciamento é uma tecnologia amplamente utilizada para proteger o peixe congelado durante a conservação. Sendo que as flutuações de temperatura que ocorrem com frequência durante o manuseio e transporte do peixe congelado causam perdas no glaciamento, reduzindo seu efeito protetor. Assim, é de grande importância para o desenvolvimento de revestimentos a combinação das características positivas mencionadas do glaciamento com uma proteção mais prolongada (SOARES, MENDES, VICENTE, 2013).

O uso de revestimentos pode ter um efeito benéfico sobre a qualidade de produtos alimentares congelados, uma vez que eles atuam como uma barreira contra a transferência de umidade e de permeabilidade ao oxigênio (RODRIGUEZ-TURIENZO *et al.*, 2011). Peixes contêm gordura oxidável. Por esta razão, a aplicação de películas e revestimentos antioxidantes para esses produtos pode ser benéfica (BONILLA *et al.*, 2012, RODRIGUEZ-TURIENZO, COBOS, DIAZ, 2012, LI *et al.*, 2013). A aplicação do revestimento, em

combinação com outros fatores de exaustão microbiana, no músculo do peixe fresco é outra possibilidade (ELSABEE, ABDON, 2013).

O revestimento de quitosana aplicado sobre a superfície do peixe pode atuar como uma barreira, e assim, retardar a oxidação lipídica. Além disso, a quitosana pode reduzir a oxidação de lípidos por quelantes de íons ferrosos presentes nas proteínas de peixe, eliminando assim, a sua atividade pró-oxidante ou a sua conversão em íon férrico. A capacidade da quitosana de se combinar com o lípido, também exerce um papel importante na sua atividade antioxidante (DUAN *et al.*, 2010).

Dependendo das características desejadas, vários materiais podem ser utilizados, isoladamente ou em combinação, para preparar os revestimentos. Como uma regra geral, as proteínas são utilizadas para proporcionar estabilidade mecânica, os carboidratos são aplicados para controlar a transmissão de oxigênio e outros gases e gorduras são utilizados para reduzir a transferência de água (PAVLATH, ORTS, 2009).

Portanto, alimentos com um alto nível de gorduras insaturadas, que são facilmente oxidados, tais como peixes, seriam mais bem protegidos por uma barreira de carboidratos (SOARES, MENDES, VICENTE, 2013). Os filmes feitos a partir de proteínas e carboidratos são excelentes barreiras ao oxigênio, por causa da sua estrutura de rede bem ordenada de ligações de hidrogênio (BONILLA *et al.*, 2012).

O oxigênio é responsável por muitos processos de degradação em alimentos, tais como a oxidação lipídica, o crescimento do micro-organismo, o escurecimento enzimático e a perda de vitaminas. A oxidação de gordura resulta em off-flavor, perda de cor e de nutrientes. Processos oxidativos causam a degradação das proteínas da carne, pigmentos e lipídios, o que limita a vida útil. Dessa forma, as interações com o oxigênio devem ser limitadas. A aplicação de filmes e revestimentos envolve dois mecanismos: o efeito de barreira de oxigênio e a atividade específica quando agentes antioxidantes são incorporados. No entanto, o aumento do teor de água do filme reduz efeito de barreira ao oxigênio, mas pode melhorar a ação química dos antioxidantes. Por esta razão, o teor de umidade do alimento e a umidade relativa no ambiente devem ser considerados a fim de desenvolver filmes e revestimentos eficazes (BONILLA *et al.*, 2012).

À medida que aumenta a umidade relativa, mais moléculas de água interagem com o material e a película se torna mais plastificada. Nestas condições, a mobilidade e a grande transferência de massa através da película são favorecidas. Em condições secas (produtos com baixa umidade) a estrutura da rede do filme ou revestimento é bem ordenada e sua permeabilidade ao oxigênio é muito limitada. Este mecanismo pode por si só ter os efeitos

positivos sobre a conservação da qualidade, devido à disponibilidade reduzida de oxigênio no produto revestido (BONILLA *et al.*, 2012).

No entanto, nas condições de mobilidade molecular reduzida nenhuma atividade química dos agentes antioxidantes pode ser observada, sendo o único efeito antioxidante devido à barreira ao oxigênio. Por outro lado, nos sistemas úmidos, a rede de revestimento é plastificada e a transferência de massa é favorecida. Neste contexto, a permeabilidade da película ou revestimento ao oxigênio é aumentada drasticamente e a atividade específica de agentes antioxidantes poderia tornar-se mais relevante (BONILLA *et al.*, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 70 filés de pargo da espécie *Lutjanus purpureus*, com peso médio de 185 g cada, obtidos numa indústria de beneficiamento de pescado localizada em Fortaleza – CE. Logo após serem adquiridos, os peixes foram colocados no gelo e transportados em caixas isotérmicas até o Laboratório de Processamento de Carnes e Pescado do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará no menor intervalo de tempo possível a uma temperatura de $2\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.

Para a elaboração da solução formadora de filme, utilizada em um dos tratamentos, foi utilizada quitosana de alto peso molecular, obtida da Polymar Indústria e Comércio LTDA, com 90 % de desacetilação.

3.1 Tratamentos das amostras

Após chegarem ao laboratório, as amostras foram separadas em três grupos, submetidas ao congelamento e posteriormente dois deles receberam tratamentos distintos. Dessa forma, temos:

- Controle (C) – filés de pargo congelados: os filés foram submetidos a congelamento lento, em freezer, até atingirem uma temperatura de aproximadamente $-18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, em que foram mantidos durante o armazenamento;
- Tratamento I (T. I) – filés de pargo congelados submetidos ao glaciamento: os filés de peixe congelados (-18 °C) foram imersos em água refrigerada com temperatura de $1 - 3\text{ °C}$ durante 5 a 10 segundos. Este procedimento foi repetido quatro vezes em intervalos de 2 a 3 minutos, para que se obtivesse uma camada de gelo de aproximadamente 10 % de peso (BOLSSON, 2012).
- Tratamento II (T. II) – filés de pargo congelados revestidos com solução de quitosana 1 %: 10 g de quitosana foram misturadas a 1000 mL de ácido láctico 1 %, agitadas durante 1 hora e refrigerada ($1 - 3\text{ °C}$). Posteriormente, os filés de peixe foram imersos na solução de quitosana durante 30 segundos e, em seguida, foram drenados e colocados no freezer (FAN *et al.*, 2009).

Cada filé foi embalado individualmente em sacos de polietileno e submetidos a armazenamento congelado a uma temperatura de aproximadamente $-18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante um

período de 180 dias. As análises microbiológicas e físico-químicas foram realizadas a cada 30 dias.

3.2 Análises microbiológicas

3.2.1 Processamento e diluição das amostras

Os filés de pargo de cada tratamento foram macerados para serem homogeneizados utilizando como diluente solução salina 1 % de NaCl para *Vibrio* e 0,85 % de NaCl para os demais micro-organismos.

Para as análises de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis, *Pseudomonas*, Estafilococos coagulase positiva e *Vibrio* foram pesados 25 g de filés de pargo macerado e colocados em 225 mL de solução salina, que correspondeu à diluição 10^{-1} . A partir desta foram feitas diluições seriadas até 10^{-4} .

3.2.2 Contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC)

A quantificação da população microbiana heterotrófica cultivável foi realizada a partir do plaqueamento em meio plate count agar (PCA) pela técnica de *pour plate* (DOWNES; ITO, 2001) utilizando solução salina 0,85% como diluente. Para tanto foi derramada uma alíquota de 1 mL das diluições em cada placa e sobre esta 15 mL do meio de cultura a 45 °C. Esse procedimento foi feito em duplicata. Após a incubação, por 48 horas a 30 °C foi feito a contagem do número de unidades formadoras de colônias (resultados expressos em UFC/g de filé de pargo).

3.2.3 Contagem de *Vibrio*

Das diluições em solução salina 1 % foi tomada uma alíquota de 200 µL e inoculada em placas do meio de cultura ágar TCBS (Tiosulfato-Citrato Bile-Sacarose) através da técnica de *spread plate* com auxílio de um bastão de vidro em “L” (alça de Drigalski) e incubadas a 35 °C por 24 horas. Sobre a superfície do meio foram contadas, separadamente, as colônias sacarose positivas e negativas respeitando o intervalo de 25 (vinte e cinco) a 250 (duzentas e cinquenta) colônias em cada placa (DOWNES; ITO, 2001). O procedimento foi realizado em duplicata.

3.2.4 Quantificação de Estafilococos coagulase positiva

Para a quantificação de Estafilococos coagulase positiva foi utilizada uma alíquota de 200 µL das diluições em solução salina 0,85 % e plaqueadas através da técnica de *spread plate* sobre o meio de cultura Ágar Baird Parker e incubadas a 35 °C por 48 h (DOWNES; ITO, 2001).

3.2.5 Pesquisa de *Salmonella*

A investigação da presença de *Salmonella* seguiu a técnica descrita por Wallace e Hammack (2009). Foram pesadas 25 g de amostras e colocadas em Caldo Lactosado e incubadas *overnight* em estufa a 35 °C para uma etapa de pré-enriquecimento. Em seguida, foi realizada a etapa de plaqueamento diferencial em que o material foi inoculado em meios seletivos Ágar Entérico Hektoen e Ágar Verde Brillante.

Colônias suspeitas foram isoladas, purificadas e submetidas à análise antigênica usando o anti-soro O:H para identificação de *Salmonella*.

Para o teste de soroaglutinação em placa foi utilizado o soro O:H polivalente. Foi colocado 1 mL de salina 0,85 % de NaCl sobre as culturas puras. Posteriormente, foram retiradas duas gotas da suspensão salina e colocadas em uma placa previamente esterilizada. Logo após, foram colocadas sobre a suspensão bacteriana duas gotas do antígeno. Homogeneizou-se por um minuto e verificou-se a presença de grumos em caixa de Huddleson, indicando a reação antígeno-anticorpo (WALLACE; HAMMACK, 2009).

3.2.6 Análise de *Pseudomonas*

Para a quantificação de *Pseudomonas* foi utilizada uma alíquota de 200 µL das diluições em solução salina 0,85 % e plaqueadas através da técnica de *spread plate* sobre o meio de cultura Ágar Cetrimide e incubadas a 35 °C por 48 h (DOWNES; ITO, 2001).

3.3 Análises físico-químicas

3.3.1 Bases voláteis totais (BVT)

Foram pesadas em balança analítica (Ohaus Analytical Standard model AS200) 10,0 ± 0,1 gramas de amostra triturada em multiprocessador (Hamilton Beach, modelo 70595)

e colocadas em tubos digestores de proteína, os quais foram adicionados 2 (dois) gramas de óxido de magnésio e 80 mL de água destilada. Em seguida o tubo contendo a amostra foi conectado ao aparelho de destilação de proteína (Tecnal, modelo TE - 036/1) e o destilado foi recebido em um erlenmeyer contendo 25 mL de ácido bórico a 2% e 3 (três) gotas do indicador misto vermelho de metila e verde de bromocresol. A amostra foi destilada durante 25 minutos e o destilado foi então titulado com ácido sulfúrico a 0,05 N. Os resultados foram expressos em mg de N/100g de filé de pargo, de acordo com AOAC (2005), conforme fórmula abaixo:

$$\text{mg N-BVT} / 100 \text{ g} = \frac{V \times N \times 1400}{PA} \quad (1)$$

Onde: V = volume do ácido gasto na titulação (mL),

N = normalidade do ácido,

PA = peso da amostra (g).

3.3.2 Trimetilamina (TMA)

Para a preparação do extrato foram pesadas em balança analítica (Ohaus Analytical Standard model AS200) $50,0 \pm 0,1$ gramas de amostra triturada em multiprocessador (Hamilton Beach, modelo 70595) e adicionados 50 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e a mistura macerada por 1 minuto em grau de porcelana. O homogeneizado foi deixado em repouso por meia hora (30 minutos) e em seguida filtrado em papel filtro quantitativo faixa branca. Nas placas de microdifusão de Conway foram adicionados 2 mL de ácido bórico a 1% contendo indicador misto de Tashiro no compartimento central, e, no compartimento externo, 2 mL do extrato de filé de pargo, mais 1 mL de formol a 35% previamente neutralizado e, finalmente, 2 mL de solução saturada de carbonato de potássio. As tampas contendo graxa de silicone na parte rugosa foram imediatamente colocadas sobre as placas que foram presas com grampos de metal, giradas suavemente para homogeneização do conteúdo externo e mantidas a 35-36 °C em estufa por 2 horas. Após esse período, foram retiradas as tampas e titulado o nitrogênio da trimetilamina com uma solução de ácido clorídrico a 0,01N. O conteúdo de N-TMA foi expresso em mg de N/100 g de filé de pargo, segundo metodologia de micro difusão de Conway (CONWAY, BYRNE, 1933), calculado através da fórmula:

$$\text{mg N-TMA} / 100 \text{ g} = \frac{(V \times N \times 1400) \times (T+U)}{V_A \times P} \quad (2)$$

Onde: V = volume (mL) do ácido HCl 0,01N gasto na titulação,

N = normalidade da solução de HCl 0,01N,

T = volume (mL) da solução de TCA a 10% usado,

U = umidade da amostra,

V_A = volume (mL) da alíquota do extrato,

P = peso da amostra utilizada no preparo do extrato (g).

3.3.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Em um tubo de boca larga, foram pesadas em balança analítica (Ohaus Analytical Standard model AS200) $10,0 \pm 0,1$ gramas de amostra triturada em multiprocessador (Hamilton Beach, modelo 70595). Em seguida, foi adicionado 1 mL da solução de BHT e 40 mL da solução de TCA 5 % que foram homogeneizados em um triturador do tipo Marconi (Modelo TE102, Piracicaba – SP). O homogeneizado resultante foi centrifugado durante 10 minutos a $10.000 \times g$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando-se centrífuga Beckman J2-21. O sobrenadante foi filtrado, transferido para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com solução de TCA 5%. Posteriormente, de cada balão retiram-se 2 mL (em triplicata) que foram transferidos para tubos de ensaio com tampa. Após a adição de 2 mL da solução de TBA os tubos foram vedados, agitados e aquecidos em banho-maria fervente por 50 minutos. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 531 nm.

Para esta determinação foi construída uma curva padrão de calibração com reagente 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) para o cálculo dos níveis de TBARS nas amostras. Os resultados foram expressos em mg de malonaldeído (MDA)/Kg de filé de pargo (RAHARJO *et al.*, 1992 modificada por FACCO, 2002) e o conteúdo de TBARS foi calculado através da fórmula:

$$\text{mg MDA} / \text{Kg} = \frac{25 \times C}{P} \quad (3)$$

Onde: C = concentração (μg MDA/2 mL) correspondente a absorbância lida (curva padrão)

P = peso da amostra

3.3.4 pH

Foram pesadas $5,0 \pm 0,1$ gramas da amostra em balança analítica (Ohaus Analytical Standard model AS 200) e adicionados 50 mL de água destilada os quais foram homogeneizados com um bastão de vidro. Em seguida foi realizada a leitura do pH em potenciômetro (Tecnal, modelo Tec – 5) (AOAC, 2005).

3.3.5 Cor

Utilizou-se para determinação o colorímetro Konica Minolta, modelo Chroma Meter CR – 410, operando no sistema CIE (L^* , a^* e b^*). O componente L^* mede a luminosidade que varia de 0 (preto) a 100 (branco), o componente a^* descreve a intensidade da cor vermelha ($a^* > 0$) e o b^* a intensidade da cor amarela ($b^* > 0$). A cor foi mensurada em três posições do peixe, tanto do músculo quanto da pele, colocando o equipamento em contato com a superfície do filé de pargo. A calibração do aparelho foi realizada por meio de placa de cerâmica branca e as medidas tomadas de forma direta através das médias dos valores.

3.3.6 Textura instrumental (Força de cisalhamento)

A força necessária para cortar transversalmente (força de cisalhamento) do filé de pargo foi medida em texturômetro TA-XT plus Texture Analyser (Stable Micro System), equipado com lâmina Warner Bratzler, operando com velocidade de 10 mm/s. Os resultados foram expressos em kgf, através da média de cinco repetições.

3.3.7 Composição centesimal

A composição centesimal foi realizada no início e no final do experimento com a finalidade de caracterizar a amostra e verificar se ao final do armazenamento esta sofreu alterações significativas. Foram realizadas as seguintes análises: cinzas, umidade, lipídios e proteínas, as quais foram determinadas seguindo a metodologia descrita pela AOAC (2005).

3.3.7.1 Cinzas

Para a determinação do teor de cinzas foram pesadas em balança analítica (OHAUS, modelo AS 200) $5,0 \pm 0,01$ gramas da amostra em cadinhos de porcelana previamente secos e pesados. O teor de cinzas foi determinado por incineração da matéria orgânica em forno mufla a $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ (QUIMIS, modelo, Q318M) até obtenção das cinzas. Logo após, os cadinhos contendo as cinzas foram colocados em dessecador e quando atingiram a temperatura ambiente foram pesados novamente. O teor de cinzas foi expresso em percentagem (%), o qual foi calculado usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ cinzas} = \frac{(PCC - PVC) \times 100}{PA} \quad (4)$$

Onde: PCC – peso do cadinho com cinzas (g),

PCV – peso do cadinho vazio (g),

PA – peso da amostra (g).

3.3.7.2 Umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por método gravimétrico, onde foram pesadas em balança analítica (OHAUS, modelo AS 200) $5,0 \pm 0,01$ gramas da amostra em cápsulas de porcelana previamente secas e pesadas. As amostras foram secas a temperatura de 105°C em estufa (FANEM, modelo 315 SE) até peso constante. Em seguida, foram colocadas em dessecador até atingir a temperatura ambiente para que pudessem ser pesadas novamente. O teor de umidade foi expresso em percentagem (%), o qual foi calculado usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ umidade} = \frac{(PCAU - PAAS) \times 100}{PA} \quad (5)$$

Onde: PCAU – peso da cápsula mais amostra úmida (g),

PAAS – peso da cápsula mais amostra seca (g), PA – peso da amostra (g).

3.3.7.3 Lipídios

O teor de lipídios foi determinado pelo método de Soxhlet. A amostra previamente desidratada foi envolta em papel filtro e em seguida, colocada no extrator de

gordura (TECNAL, modelo TE - 044), onde foram acoplados os tubos receptores de gordura, previamente secos e pesados e a estes, adicionados 100 mL de hexano P.A. O sistema de extração foi ligado e permaneceu em refluxo por 6 horas. Após esse tempo os tubos foram levados para estufa (FANEM, modelo 315 SE) a 105 °C por um período de 2 (duas) horas. Em seguida, os tubos contendo a gordura foram colocados em um dessecador, onde permaneceram até atingir a temperatura ambiente para que pudessem ser pesados em balança analítica (OHAUS modelo AS 200). O teor de lipídios foi expresso em percentagem (%), o qual foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ lipídios} = \frac{(PTG - PTV) \times 100}{PA} \quad (6)$$

Onde: PTG – peso do tubo mais gordura (g),

PTV – peso do tubo vazio (g),

PA – peso da amostra (g).

3.3.7.4 Proteína

O teor de proteína foi determinado pelo método de Kjeldhal, o qual determina o percentual de nitrogênio total e este é convertido em proteína multiplicando-se pelo fator 6,25. Foram pesados 1,0 ± 0,01 grama da amostra em papel manteiga. A pesagem foi realizada em balança analítica (OHAUS modelo AS 200). As amostras foram colocadas nos tubos de digestão de proteínas e a seguir foi adicionado a mistura catalítica (9 g de Na₂SO₄ anidro, 1 g de CuSO₄) e 15 mL de ácido sulfúrico P.A concentrado. Os tubos foram então levados ao digestor de proteínas (TECNAL, modelo TE 008/50) onde permaneceram a 350 °C até a completa digestão. Em seguida, foram adicionados 50 mL de água destilada nos tubos. Estes contendo a amostra digerida e a água foram conectados ao destilador (TECNAL, modelo Te-036/1) de nitrogênio e em seguida alcalinizados com 50 mL de NaOH a 45%, sendo o nitrogênio destilado, recebido em um erlenmeyer contendo 50 mL de solução padronizada de ácido sulfúrico 0,1N e 4 gotas de vermelho de metila. Após a destilação foi iniciado o processo de titulação, o qual foi feito com solução padronizada de hidróxido de sódio 0,1N até a viragem do indicador. O teor proteico foi expresso em percentagem (%) e calculado usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ proteína} = \frac{[(Vg H_2SO_4 \times N H_2SO_4) - (Vg NaOH \times N NaOH)] \times (0,014 \times 6,25 \times 100)}{PA} \quad (6)$$

Onde: $V_{\text{gH}_2\text{SO}_4}$ – volume gasto da solução de ácido sulfúrico (mL),
 V_{gNaOH} – volume gasto da solução de hidróxido de sódio (mL);
 $N_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ – normalidade da solução de ácido sulfúrico,
 N_{NaOH} – normalidade da solução de hidróxido de sódio.

3.4 Análises estatísticas

Para se proceder à análise estatística, os dados foram compilados no programa Microsoft Office Excel 2007 e processados no programa estatístico Statistica Release 7.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Foram calculados a média e o desvio padrão e aplicado teste de Tukey para a avaliação de diferença significativa ($p < 0,05$).

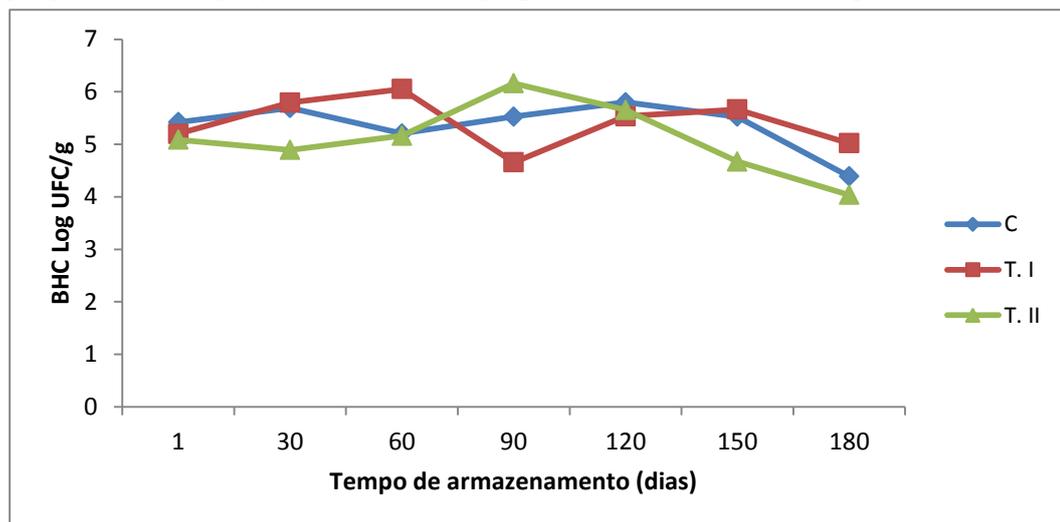
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises microbiológicas

Os resultados encontrados com a realização das análises microbiológicas estão apresentados nas Figuras 1, 2 e 3. Durante a avaliação dos resultados deve-se considerar a individualidade das amostras, uma vez que cada amostra é proveniente praticamente de peixes diferentes, pois cada peixe fornece somente dois filés, apesar de terem sido submetidas aos mesmos tratamentos. Dessa forma, os filés são únicos e apresentam cargas microbianas diferenciadas tanto em quantidade como em qualidade.

Não foi observado crescimento de micro-organismos em filés de pargo congelados durante o tempo de armazenamento de 180 dias. A contagem de BHC nos filés de pargo congelados diminuiu nos três grupos durante o período analisado (Figura 1). Nas amostras do grupo Controle esse valor passou de 5,42 no 1º dia para 4,39 log UFC/g no último dia de armazenamento. Já as amostras do Tratamento I foram de 5,20 para 5,02 log UFC/g e, finalmente, as do Tratamento II de 5,09 para 4,04 log UFC/g no mesmo período de armazenamento.

Figura 1 - Contagem de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC) nos filés de pargo (*Lutjanus purpureus*) dos três grupos armazenados a -18°C por 180 dias.



FONTE: Elaborada pela autora.

C: Controle;

T. I: Glaciado;

T. II: Revestido com solução de quitosana.

Nota-se que tanto para o Controle como para o Tratamento II essa redução foi de 1 ciclo logaritmico, o que não foi observado para o Tratamento I. No entanto, a utilização de

quitosana no revestimento das amostras do Tratamento II não foi diferencial quantitativamente tanto com relação ao Controle quanto ao Tratamento I, ou seja, não se mostrou eficaz no controle do crescimento de BHC.

Fan *et al.* (2009), ao estudarem os efeitos do revestimento de quitosana sobre a qualidade e vida útil da carpa prateada durante o armazenamento congelado, observaram que a contagem inicial de viáveis totais (CVT) do peixe foi de 2,9 log UFC/g, indicando sua boa qualidade. Observaram também que a CVT começou a aumentar mais lentamente nas amostras revestidas com quitosana e chegou a 6,9 log UFC/g no 30º dia do armazenamento congelado, enquanto que a CVT de amostra controle chegou a cerca de 7,1 log UFC/g no 25º dia, durante o mesmo período. O resultado indicou que o revestimento com solução de 2% de quitosana foi eficaz para estender a vida útil dos peixes armazenados a -3°C para 30 dias, em comparação com 25 dias para a amostra controle, e a redução significativa na CVT observadas nas amostras revestidas com quitosana foi atribuída ao efeito inibitório da quitosana em bactérias deteriorantes.

Duan *et al.* (2010), ao avaliarem a melhoria da qualidade do bacalhau (*Ophiodon elongates*) congelado através do emprego de revestimento de quitosana incorporado com óleo de peixe, constataram que os revestimentos de quitosana resultaram em reduções na contagem total de placa, e essas eram mais baixas do que 10^3 UFC/g no final de 2 e 3 meses de armazenamento, o que mostrou que não houve crescimento.

Segundo Mol *et al.* (2007), a contagem de viáveis totais em produtos da pesca é de 7-8 log UFC/g no ponto de rejeição sensorial. No entanto, para garantir a segurança dos produtos considera-se uma contagem ainda mais baixa. Não há um limite de aceitabilidade para os micro-organismos psicrófilos. Já para os mesófilos, há um limite de 10^6 UFC/g (6 log UFC/g).

Mol *et al.* (2007), ao estudarem o efeito das bactérias psicrófilas na estimativa da qualidade de peixes, observou que a contagem de bactérias aeróbias psicrófilas da cavala foi muito alta, e as amostras foram consideradas estragadas no primeiro dia de armazenamento. Para as outras amostras, a contagem de bactérias aeróbicas psicrófilas foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que no início de armazenamento quando as amostras estragaram.

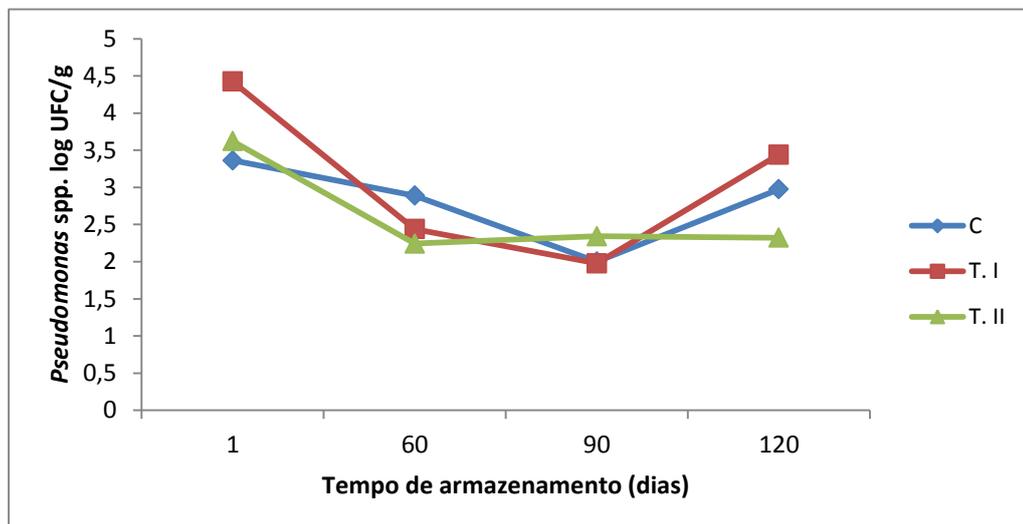
Na contagem de *Pseudomonas* spp., as amostras dos três grupos de filés de pargo congelados mostraram uma tendência à diminuição. A população de *Pseudomonas* spp. em filés de pargo não revestidos diminuiu levemente de 3,36 log UFC/g no dia 1 para 2,98 log UFC/g no 120º dia de armazenamento congelado (Figura 2). O filé de pargo com revestimento de quitosana também apresentou redução na contagem de *Pseudomonas* spp.,

que passou de 3,62 para 2,32 log UFC/g no mesmo período. Nota-se que o Tratamento II a partir do dia 60 apresentou comportamento estável, devido provavelmente ao efeito bacteriostático da quitosana, que barrou a multiplicação desses micro-organismos.

No presente estudo, durante os 180 dias de armazenamento congelado ($-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), a contagem de *Pseudomonas* spp. foi sempre maior que 1 log UFC/g em todas as amostras, havendo, portanto, uma carga considerável. No entanto, nos dias 30, 150 e 180 não houve detecção de células viáveis nas amostras analisadas. Isso se deve ao fato de que quando os micro-organismos encontram-se em condições extremas, como é o caso da temperatura de congelamento utilizada, estes mantem seus metabolismos praticamente nulos, encontrando-se numa situação não cultivável.

Kanatt *et al* (2012), ao estudarem filmes de quitosana com álcool polivinílico e extratos naturais, observaram que todos os filmes formados foram ineficazes contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens*. Isto pode ser devido aos lipopolissacárides da parede celular de bactérias Gram-negativas que podem impedir que os componentes ativos atinjam a membrana citoplasmática. Essas bactérias parecem apresentar maior resistência com relação ao efeito da quitosana.

Figura 2 - Quantificação de *Pseudomonas* spp. dos filés de pargo (*Lutjanus purpureus*) dos três grupos armazenados a -18°C por 180 dias.



FONTE: Elaborada pela autora.

C: Controle;

T. I: Glaciado;

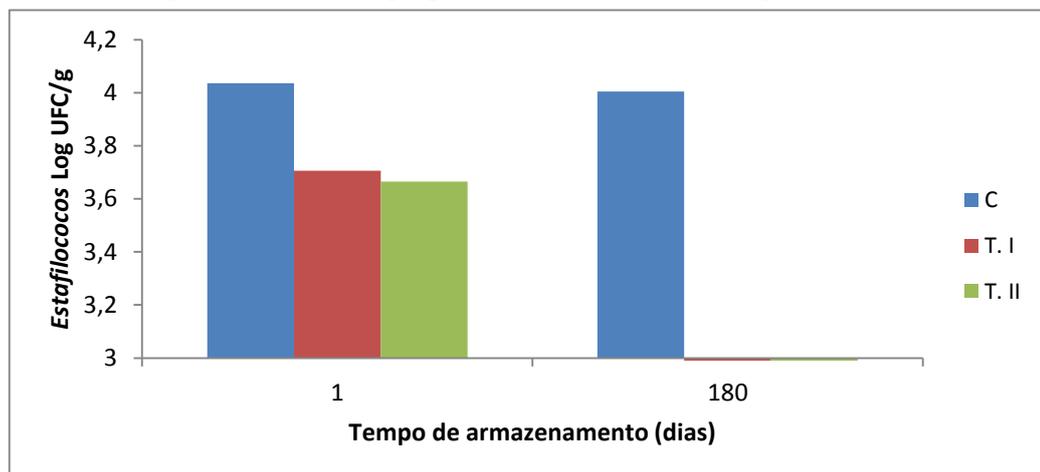
T. II: Revestido com solução de quitosana.

Cao *et al* (2012), ao avaliarem o efeito da quitosana na vida útil de filé de tilápias refrigeradas, detectaram *Pseudomonas*, *Aeromonas* e *Staphylococcus* nas amostras. Entre

estas, *Pseudomonas* foi a espécie dominante representando 52% do total de bactérias deteriorantes, seguida de *Aeromonas* (32%) e *Staphylococcus* (12%). Estes são consistentes com os encontrados anteriormente por Gram e Huss (1996) que mostraram que a população bacteriana deteriorante do peixe é composta principalmente por *Pseudomonas* spp. e *S. putrefaciens* durante armazenamento congelado aeróbio.

De acordo com os dados obtidos, foi verificado crescimento de colônias características de bactérias Estafilococos coagulase positiva em todos os grupos no 1º dia de análise (Figura 3). Isto já era esperado, uma vez que se trata de uma bactéria não marinha, cujo contágio se dá durante as etapas de manipulação, sendo as mãos dos manipuladores a principal fonte de contaminação desses micro-organismos.

Figura 3 - Quantificação de Estafilococos coagulase positiva dos filés de pargo (*Lutjanus purpureus*) dos três grupos armazenados a -18°C por 180 dias.



FONTE: Elaborada pela autora.

C: Controle;

T. I: Glaciado;

T. II: Revestido com solução de quitosana.

A produção de coagulase é atributo do *Staphylococcus aureus*, sendo esse micro-organismo de grande importância nos surtos de infecção alimentar por apresentarem risco para a saúde pública pela produção de enterotoxinas. Essa bactéria pode ser encontrada em diferentes regiões do corpo como as mãos, garganta, faringe, glândulas mamárias, trato intestinal e urinário, dos quais por contaminação cruzada contamina o pescado (FARIAS, 2006).

Os valores iniciais para os grupos Controle, Tratamento I e Tratamento II foram 4,04, 3,71 e 3,67 log UFC/g, respectivamente (Figura 3). Considerando o limite máximo de 10^3 UFC/g estabelecido para Estafilococos coagulase positiva, conforme RDC nº 21 de

02/01/2001 ANVISA/MS (BRASIL, 2001), todas as amostras ultrapassaram os parâmetros microbiológicos aceitáveis no dia 1, apresentando uma alta carga desse micro-organismo.

A carga de Estafilococos coagulase positiva manteve-se praticamente inalterada durante o período de armazenamento no Controle, passando de 4,04 no 1º dia para 4,00 log UFC/g no 180º dia. Dessa forma, tem-se que a temperatura de armazenamento utilizada neste trabalho não foi eficiente para reduzir a carga microbiana das amostras para este micro-organismo.

Já no último dia do período analisado, não foi observado crescimento dessas bactérias tanto no Tratamento I como no Tratamento II. Isso pode ser explicado pelo fato dos revestimentos utilizados nesses dois grupos terem reduzido consideravelmente as trocas gasosas na superfície das amostras, o que é imprescindível para o crescimento desses micro-organismos. Portanto, podemos afirmar que os revestimentos foram eficientes para reduzir a carga microbiana desse grupo.

Rao *et al* (2010) observaram que as películas de quitosana foram eficazes tanto contra *Escherichia coli* como *Staphylococcus aureus*, ao estudarem filmes de quitosana e goma guar. Uma das razões apresentadas para o carácter antimicrobiano da quitosana é que seu grupo amino contendo cargas positivas, interage com as membranas das células microbianas carregadas negativamente, que conduz à fuga dos componentes proteicos intracelulares, como também outros compostos intracelulares dos micro-organismos.

Vibrio sp., incluindo *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* são exemplos de bactérias patogênicas que habitam ambientes costeiros e aquáticos tropicais. Eles são frequentemente associados em surtos de origem alimentar na Ásia (BERNBOM *et al.*, 2009). Com relação à pesquisa de *Vibrio* não se observou crescimento em nenhum grupo, sendo o limite máximo permitido pela legislação vigente o valor de 10^3 UFC/g (BRASIL, 2001). Essa ausência pode ser devido ao baixo pH das amostras o que impede o crescimento desse micro-organismo.

Farias (2006), ao avaliar as condições higiênico-sanitárias do pescado beneficiado em indústrias paraenses e aspectos relativos à exposição para consumo em Belém-Pará, encontrou como Número Mais Provável (NMP) o nível de <10 NMP/g de *Vibrio parahaemolyticus* na análise microbiológica de 50 amostras, estando, portanto, 100% das amostras de acordo com o padrão estabelecido na Legislação Federal.

No que se refere à *Salmonella*, foi constatada ausência desta bactéria nas amostras de todos os grupos. Esse resultado mostrou-se em conformidade com o parâmetro estabelecido pela legislação, ausência em 25 gramas de pescado congelado (BRASIL, 2001).

Esse resultado está em conformidade com os resultados encontrados por Farias (2006), que foi de ausência de *Salmonella* em 100% das amostras analisadas.

Em estudo sobre o efeito do filme de quitosana no crescimento de *Salmonella* spp. em sopa de peixe, Fernandez-Saiz *et al* (2010) observaram que os filmes de quitosana mostraram um efeito antimicrobiano notável, e isso foi diretamente relacionado com o peso do filme. Assim, quando elevadas quantidades de película eram testadas (40 ou 80 mg), a viabilidade celular era completamente reduzida quase que imediatamente na maioria dos casos. Concluíram ainda que *Salmonella* spp. foi o microrganismo testado mais resistentes a quitosana em 12° e 37 °C, sendo que não foi capaz de crescer a 4 °C.

4.2 Análises físico-químicas

4.2.1 Bases voláteis totais (BVT)

As Bases Voláteis Totais que são compostas principalmente de amônia e amins primárias, secundárias e terciárias, constituem um parâmetro amplamente utilizado como um indicador da degradação da carne de pescado. Seu aumento está relacionado com a atividade de bactérias deteriorantes e enzimas endógenas (FAN *et al.*, 2009).

Os valores de BVT, expressos em mg de N-BVT/100 g de filé de pargo, para os três grupos durante a estocagem por 180 dias estão apresentados na Tabela 2.

Verificou-se que os valores iniciais de BVT para os grupos Controle e Tratamentos I e II foram de 28,66, 24,03 e 24,36 mg N-BVT/100 g de filé de pargo, respectivamente (Tabela 2). Nota-se que esses valores encontravam-se elevados desde o 1° dia de estocagem, uma vez que valores de 30-35 mg N/100 g para BVT são geralmente considerados como o limite máximo de aceitabilidade para pescado (MOHAN *et al.*, 2012).

A determinação de BVT, embora largamente utilizada como índice de qualidade do pescado, é causa de controvérsia entre pesquisadores, principalmente quanto ao estabelecimento de limites de aceitação do produto. Um valor próximo a 30 mg N-BVT/100 g tem se mostrado compatível com outros parâmetros de avaliação, levando alguns países como Alemanha, Austrália e Japão a adotarem oficialmente este valor como limite máximo tolerável para a comercialização (SANTOS, 2011).

Tabela 2 - Valores de bases voláteis totais (mg de N-BVT/100 g) de filés de pargo (*Lutjanus purpureus*) dos três grupos armazenados a -18 °C por 180 dias.

Grupos	Tempo de armazenamento (dias)						
	1	30	60	90	120	150	180
C¹	28,66 ^{Aa} ±0,00	27,53 ^{Aac} ±0,00	28,46 ^{Aa} ±0,00	28,05 ^{Aa} ±0,29	26,21 ^{Abc} ±0,00	26,15 ^{Abc} ±1,00	25,29 ^{Ab} ±1,02
I²	24,03 ^{Ba} ±0,00	26,38 ^{Bbc} ±0,00	25,31 ^{Babc} ±1,72	24,26 ^{Ba} ±0,71	24,56 ^{Bab} ±0,50	26,76 ^{Ac} ±0,00	25,03 ^{Aabc} ±0,06
II³	24,36 ^{Cac} ±0,00	27,81 ^{Ae} ±0,00	24,11 ^{Bab} ±0,00	26,04 ^{Cd} ±0,00	24,12 ^{Bab} ±0,48	25,74 ^{Ac} ±1,17	22,67 ^{Bb} ±0,88

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença ao nível de 95% de confiança (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Letras maiúsculas diferentes nas linhas indicam diferença ao nível de 95% de confiança (p<0,05) pelo teste de Tukey.

¹Controle; ²Glaciado; ³Revestido com solução de quitosana.

No Brasil, a Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) também estabelece o valor de 30 mg/100 g como limite máximo de BVT para pescado fresco, exceto elasmobrânquios (BRASIL, 1997). A Comunidade Européia estabelece valores limites acima do estabelecido pela legislação brasileira, sendo 35 mg/100 g para BVT e 12 mg/100 g para TMA (SANTOS, 2011).

Durante os 180 dias de estocagem, os valores de BVT variaram de 25,29 a 28,66 mg N-BVT/100 g de filé de pargo no Controle, de 24,03 a 26,76 mg N-BVT/100 g de filé de pargo no Tratamento I e de 22,67 a 27,81 mg N-BVT/100 g de filé de pargo no Tratamento II, não apresentando grandes alterações com o tempo, o que era esperado uma vez que se trata de amostras congeladas (Tabela 2).

Soares, Mendes e Vicente (2013), ao avaliarem os efeitos do revestimento de quitosana na conservação de salmão congelado, obtiveram um valor inicial de N-BVT de 7,2 mg N/100 g de salmão. Após 14 semanas de armazenamento congelado, o N-BVT do grupo controle foi de 6,8 e para as amostras revestidas foi de 7,71 mg N/100 g de salmão. Com isso, concluíram que os valores de N-BVT mantiveram-se estáveis em todos os grupos por 14 semanas de estocagem.

Comparando-se os tratamentos aplicados neste estudo, observou-se que entre o grupo Controle e o Tratamento I os resultados diferiram significativamente ($p < 0,05$) até o 120º dia, tendo o Tratamento I apresentado valores sempre inferiores nesse período. Já entre o Controle e o Tratamento II, os resultados foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) na maioria dos dias analisados, não diferindo apenas nos 30º e 150º dias, tendo o Tratamento II apresentado os menores valores. Isso nos faz perceber que tanto o glaciamento (T. I) quanto o revestimento de quitosana (T. II) apresentaram uma maior proteção das amostras em relação aos teores de N-BVT do que o Controle (C).

Wu (2014), ao avaliar o efeito do revestimento de quitosana na preservação do camarão branco durante o armazenamento parcialmente congelado, encontrou um valor inicial de N-BVT de 3,2 mg/100 g, o qual aumentou progressivamente até o décimo dia. A partir daí, o grupo controle mostrou um aumento acentuado no conteúdo de N-BVT ($p < 0,05$). Após 30 dias de armazenamento, os conteúdos de N-BVT atingiram 36,5 e 12,6 mg/100 g no grupo controle e no revestido com quitosana, respectivamente. Esses resultados sugeriram que o revestimento de quitosana pode ter retardado a formação de N-BVT.

Gonçalves & Grindi Junior (2009), ao analisarem o efeito de diferentes porcentagens de glaciamento sobre a qualidade de camarões armazenados sob congelamento, obtiveram valores iniciais entre 7,52 - 8,81 mg de N/100 g para N-BVT nas amostras

avaliadas. Tais níveis aumentaram com o tempo de armazenamento em todos os grupos e foram mais elevados nas amostras tratadas com os menores percentuais de glaciamento. No entanto, esse aumento não foi superior a 20 mg N/100 g e foi atribuído à atividade de enzimas endógenas, apesar de estar reduzida em função da temperatura de armazenamento.

4.2.2 Trimetilamina (TMA)

A maioria das espécies marinhas contém óxido de trimetilamina (OTMA) sendo que as concentrações variam de acordo com as espécies, estoque, área e época do ano, e é considerada alta nas espécies de peixes de profundidade (DALGAARD, 2000). O OTMA é um dos principais constituintes da porção de nitrogênio não protéico de teleósteos marinhos. Após a morte do pescado o OTMA é convertido em TMA através de enzimas redutase produzidas por bactérias (ZHOU *et al.*, 2011). TMA tem sido frequentemente utilizada como uma medida de degradação bacteriana em peixes e relacionada com o seu nível de qualidade sensorial (WOYEWODA *et al.*, 1986).

Os valores de TMA deste estudo, expressos em mg de N-TMA/100 g de filé de pargo, para os três grupos durante a armazenagem de 180 dias estão apresentados na Tabela 3.

Os valores iniciais obtidos de N-TMA para os grupos Controle, Tratamentos I e II foram 8,16, 8,20 e 8,66 mg N-TMA/100 g de filé de pargo, respectivamente. Esses resultados aumentaram significativamente ($p < 0,05$) no último dia de armazenamento apesar das amostras serem congeladas, atingindo 10,89 mg N-TMA/100 g de filé de pargo no Controle e no Tratamento II, e 11,79 mg N-TMA/100 g de filé de pargo no Tratamento I. Isso pode ser devido ao fato de que temperaturas de congelamento reduzem, mas não cessam a atividade de bactérias deteriorantes e enzimas endógenas.

No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece o limite de 4 mg N/100g para pescado fresco, sendo o congelado analisado de acordo com as normas previstas para o pescado fresco no julgamento de suas condições sanitárias (BRASIL, 1962). No entanto, trata-se de uma legislação defasada que precisa ser revisada, uma vez que os procedimentos evoluíram e sabe-se que esses índices dependem do período de captura dos peixes.

Um valor de 10-15 mg N/100g para TMA são geralmente considerados como o limite máximo de aceitabilidade para pescado (MOHAN *et al.*, 2012). Já a Comunidade Européia, como citado antes, estabelece um valor de 12 mg/100 g para peixes refrigerados.

Tabela 3 - Valores de trimetilamina (mg de N-TMA/100 g) de filés de pargo (*Lutjanus purpureus*) dos três grupos armazenados a -18 °C por 180 dias.

Grupos	Tempo de armazenamento (dias)						
	01	30	60	90	120	150	180
C ¹	8,16 ^{Aa} ±0,00	8,15 ^{Aa} ±1,58	7,83 ^{Aa} ±0,00	8,44 ^{Aa} ±0,00	9,39 ^{Aab} ±0,00	9,05 ^{Aab} ±1,16	10,89 ^{Ab} ±0,68
I ²	8,20 ^{Bac} ±0,01	9,57 ^{Ab} ±0,77	8,66 ^{Aab} ±0,00	7,21 ^{Bc} ±0,00	8,95 ^{Aab} ±0,73	11,86 ^{Bd} ±0,00	11,79 ^{Ad} ±0,00
II ³	8,66 ^{Ca} ±0,00	9,50 ^{Aa} ±0,01	8,64 ^{Aa} ±0,88	9,12 ^{Aa} ±0,68	9,28 ^{Aa} ±0,37	11,80 ^{Bb} ±0,04	10,89 ^{Ab} ±0,00

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Letras maiúsculas diferentes nas linhas indicam diferença ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

¹Controle; ²Glaciado; ³Revestido com solução de quitosana.

Por outro lado, Oliveira e Sales (1988), ao estudarem as alterações de frescor do pargo *Lutjanus purpureus* Poey (1867) durante as fases de pré e pós-processamento na indústria, observaram que o maior valor de TMA atingido após 20 dias de armazenamento congelado foi de 4,3 mg-N/100g.

Também existem controvérsias sobre a utilização de valores de TMA como índice de frescor. Peixes armazenados em condições idênticas, mas capturados em períodos diferentes, não apresentam teores de TMA semelhantes (SANTOS, 2011).

Notou-se que tanto para o Controle como para o Tratamento II, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos teores de TMA até o 150° e 120° dia, respectivamente. Por outro lado, o Tratamento I apresentou comportamento distinto, em que apenas a partir do 150° dia analisado não mostrou diferença estatística ($p < 0,05$) com o tempo. No que se refere aos tratamentos aplicados, no último dia não houve diferença significativa ($p > 0,05$) dos Tratamentos I e II com relação ao Controle.

Mohan *et al* (2012), ao avaliarem o efeito do revestimento de quitosana em sardinhas, registraram um conteúdo inicial de TMA de 6,01 mg N/100 g, que aumentou com o período de armazenamento tanto para as amostras controle como para as revestidas. As amostras não tratadas exibiram um aumento significativo ($p < 0,05$) atingindo um valor de 12,3 mg de N/100 g em 5 dias de armazenamento refrigerado.

Durante o armazenamento refrigerado ou congelado de peixes marinhos, OTMA é reduzido a TMA por bactérias facultativas, provavelmente *Pseudomonas* (ou *Alteromonas*) *putrefaciens*. Neste trabalho observou-se a presença de *Pseudomonas* spp. em todas as amostras durante o tempo de armazenamento de 120 dias (Figura 2). Segundo Woyewoda *et al* (1986), apesar de várias espécies de bactérias serem capazes de fazer esta redução, 80% dos produtores de TMA são *Pseudomonas*. Em armazenamento aeróbico congelado, a microbiota é composta quase que exclusivamente de *Pseudomonas* sp. e *Shewanella putrefaciens* (GRAM, HUSS, 1996).

4.2.3 TBARS

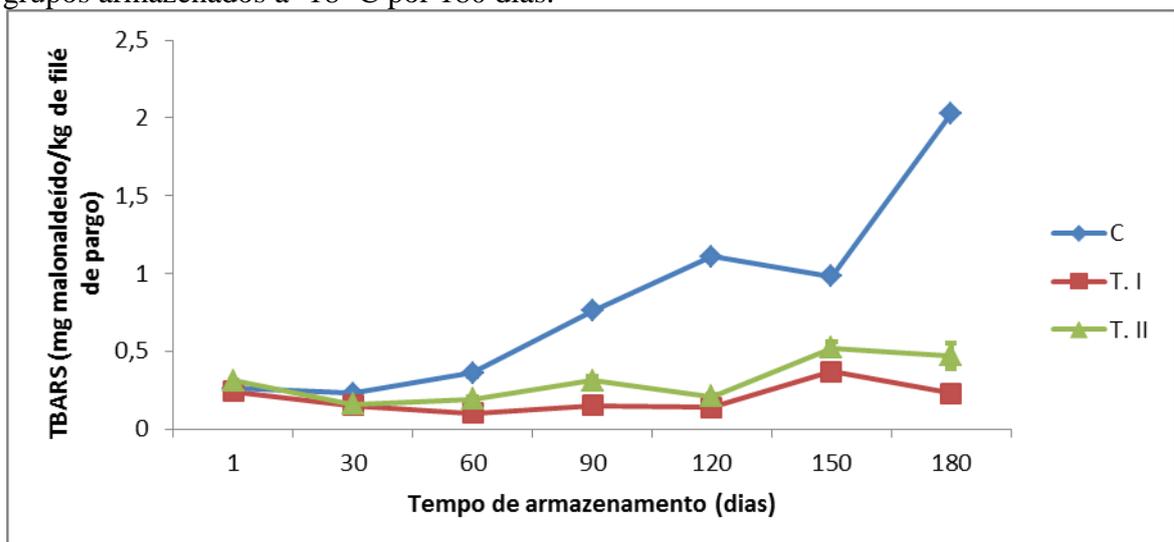
O conteúdo de TBARS é um importante índice de qualidade, que indica a oxidação lipídica. Esta provoca ranço, off-flavors e acúmulo de produtos indesejáveis potencialmente tóxicos, que levam à deterioração qualitativa do peixe é o segundo fator mais importante na deterioração dos alimentos. O valor TBA mede o teor de malonaldeído (MDA) a partir de hidroperóxidos, que são os produtos das reações iniciais entre os ácidos graxos poliinsaturados com oxigênio (DUAN *et al.*, 2010). Em temperaturas abaixo de 0 °C, a

oxidação torna-se o principal fator de deterioração e é particularmente importante para a vida útil do produto (SOARES, MENDES, VICENTE, 2013).

Comparando-se os três grupos entre si, notou-se que estes apresentaram valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em praticamente todos os dias analisados, com exceção do 30º dia, em que os Tratamentos I e II não apresentaram diferença ao nível de confiança de 95%. Dessa forma, tanto um como o outro se mostraram eficazes no retardo da oxidação dos lipídios. Isso pode ser devido ao fato de que tanto o congelamento como o revestimento com solução de quitosana pode ter agido como uma barreira impedindo o contato com o oxigênio, retardando assim a oxidação dos lipídios. Segundo Duan *et al* (2010), a capacidade da quitosana de se combinar com o lípido, também exerce um papel importante na sua atividade antioxidante.

Com relação ao tempo de armazenamento, os resultados mostraram que os valores de TBARS do Controle diferiram entre si ($p < 0,05$) em todos os dias analisados e aumentaram significativamente de um valor inicial de 0,26 para 2,03 mg MDA/kg de filé de pargo no 180º dia de armazenamento, o que indica que apenas o congelamento não impediu a oxidação lipídica dessas amostras de filés de pargo (Figura 4). Uma vez que as amostras do grupo Controle não possuíam proteção alguma, esse aumento nos teores de TBARS também pode ser atribuído à desidratação parcial do peixe (KILINCCEKER, DOGAN, KUCUKONER, 2009).

Figura 4 – Teores de TBARS das amostras de filés de pargo (*Lutjanus purpureus*) dos três grupos armazenados a -18 °C por 180 dias.



FONTE: Elaborada pela autora.

C: Controle;

T. I: Glaciado;

T. II: Revestido com solução de quitosana.

Abreu *et al* (2011) e Abreu *et al* (2010) atribuíram o processo de oxidação lipídica em peixe congelado à ação de enzimas endógenas presentes em cada espécie. As enzimas endógenas de peixes podem estar ativas durante o armazenamento congelado, mesmo a -20 °C. Estas enzimas podem ser influenciadas por uma gama de fatores internos (conteúdo e composição da enzima) e externos (intensidade e hábitos alimentares, temperatura e tempo de captura). Estes fatores devem ser considerados na comercialização e armazenamento de produtos da pesca.

Ainda considerando-se o tempo de armazenamento, nos Tratamentos I e II os teores de TBARS foram significativamente menores do que no Controle ($p < 0,05$). No Tratamento I, os teores de TBARS permaneceram praticamente inalterados passando de 0,24 para 0,23 mg MDA/kg de filé de pargo, enquanto que no Tratamento II esses valores aumentaram significativamente ($p < 0,05$) de 0,31 para 0,46 mg MDA/kg de filé de pargo no mesmo período. Além disso, T.I e T.II também diferiram entre si ($p < 0,05$), resultados estes que mostraram-se semelhantes aos encontrados por Li *et al* (2013), Li *et al* (2012¹), Li *et al* (2012²) e Ojagh *et al* (2010).

Duan *et al* (2010), observaram que o uso de revestimento de quitosana incorporado com óleo de peixe em filés de bacalhau congelados não mostrou efeito antioxidante durante o 1º mês de armazenamento ($p > 0,05$), mas diminuiu significativamente os valores de TBARS das amostras revestidas nos 3 meses posteriores ($p < 0,05$).

Fan *et al* (2009), ao estudarem o efeito do revestimento de quitosana na qualidade e vida útil de carpa preteada durante o armazenamento congelado, observaram que os valores de TBARS da amostra controle foram significativamente maior ($p < 0,05$) do que os valores correspondentes ao da amostras revestida com 2% de quitosana. Assim, concluíram que esta observação foi indicativa de que a quitosana inibiu a oxidação lipídica em carne de peixe .

Soares, Mendes e Vicente (2013), observaram que, os índices de TBARS das amostras de salmão congelado em geral mantiveram-se estáveis durante o período de armazenamento de 14 semanas, sendo que na última semana o valor TBARS dobrou para as amostras não revestidas. Perceberam, assim, o efeito protetor do revestimento de quitosana, provavelmente devido às suas propriedades antioxidantes. Assim, concluíram que a quantidade de revestimento aplicado não teve nenhuma influência sobre o controle da oxidação, o que pode significar que não é necessária a utilização de quantidades elevadas de revestimentos para inibir a oxidação dos lípidos.

4.2.4 pH

O pH de filé de peixe fresco é quase neutro. No período pós-mortem, a decomposição de compostos nitrogenados leva ao aumento do pH do filé de peixe. Este aumento do pH tem um efeito sobre a qualidade do produto durante o armazenamento, especialmente em relação às características sensoriais como odor, cor e textura que são afetados negativamente (KILINCCEKER, DOGAN, KUCUKONER, 2009, MOL *et al.*, 2007).

Na Figura 5 estão apresentados os valores de pH obtidos ao longo de 180 dias de armazenamento congelado para os três grupos.

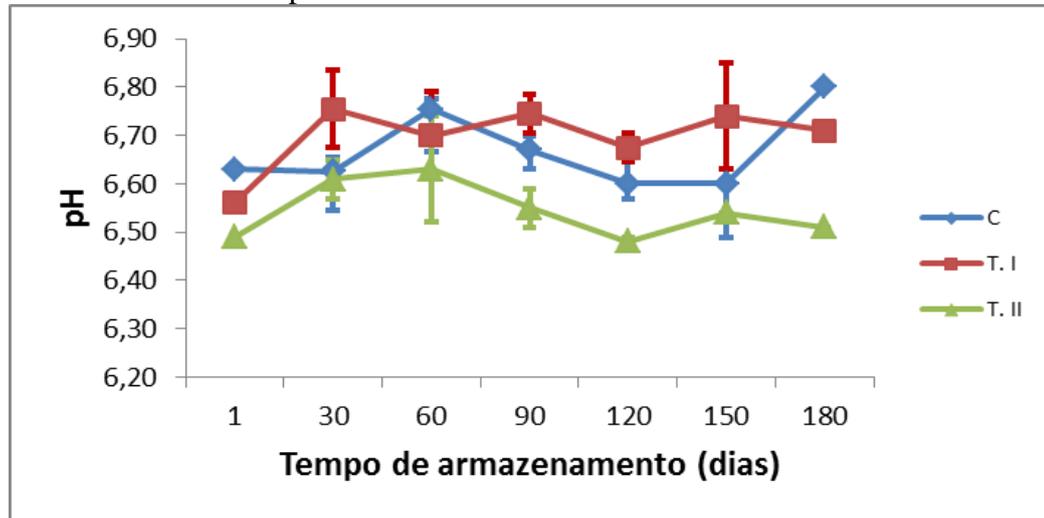
Comparando-se o 1º com o último dia, apenas no Controle observou-se significativa diferença ($p < 0,05$), em que o pH aumentou de um valor de 6,63 no 1º dia para 6,80 no 180º dia. As amostras do Tratamento I apresentaram valores de pH mais elevados em quase todo o período de armazenamento, embora não houvesse diferença estatística ($p > 0,05$) em todos os casos.

Em relação à qualidade, o MAPA (BRASIL, 1962) determina que o pH da carne de peixes na parte interna seja inferior a 6,5 e na parte externa, seja inferior a 6,8. No entanto, a medida de pH não deve ser utilizada como único índice de frescor, pois pode induzir a falsas conclusões, devendo-se levar em consideração as análises microbiológicas, físico-químicas e sensoriais (FARIAS, 2006).

Baseando-se no limite estabelecido pelo MAPA de 6,8 para aceitabilidade do produto, as amostras do grupo Controle atingiram este valor no último dia de armazenamento. Ao final do período de armazenamento, as amostras do Tratamento I atingiram um valor bem próximo ao limite, que foi de 6,71, enquanto as amostras do Tratamento II atingiram o valor de 6,51.

Durante este período, as amostras do Tratamento II apresentaram valores de pH mais baixos que as amostras dos demais grupos em todos os tempos analisados. Isso se deve provavelmente ao fato de que foi usado ácido láctico 1% como diluente da quitosana durante o preparo da solução formadora de filme. Valores baixos de pH (até 5,5) aumentam a atividade antimicrobiana da quitosana devido à sua maior solubilidade e protonação no intervalo de pH ácido (AIDER, 2010).

Figura 5 - pH das amostras de filés de pargo (*Lutjanus purpureus*) dos três grupos armazenados a -18 °C por 180 dias.



FONTE: Elaborada pela autora.

C: Controle;

T. I: Glaciado;

T. II: Revestido com solução de quitosana.

Duan *et al.* (2010), ao avaliarem a manutenção da qualidade de filés de bacalhau congelados com revestimento de quitosana incorporado com óleo de peixe, concluíram que este tratamento reduziu o teor de pH das amostras de filés de bacalhau, que foi causada pela acidez da solução de revestimento, uma vez que a quitosana foi solubilizada com ácido acético 1%.

Soares, Mendes e Vicente (2013), ao avaliar o efeito do revestimento de quitosana e do glaciamento na conservação de salmão congelado por 14 semanas, constataram que as amostras de salmão glaciadas apresentaram valores de pH aparentemente mais elevados durante quase todo o armazenamento,. As amostras revestidas com quitosana revelaram valores finais de pH ligeiramente mais baixos com relação às outras amostras e a quantidade desse revestimento não mostrou influência significativa sobre a evolução do pH. Dessa forma, concluíram que a redução de valores de pH das amostras revestidas com a quitosana poderia estar relacionada com a migração do próprio revestimento para o músculo de peixe, em que o primeiro tem um valor de pH ácido, ou com a incapacidade para remover completamente o revestimento antes da medição do pH.

Fan *et al* (2009), ao estudarem os efeitos do revestimento de quitosana sobre a qualidade e vida útil de carpa prateada durante o armazenamento congelado, concluíram que quanto mais baixo o pH melhor é a inibição microbiana e isso ainda contribui para estender a

vida útil das amostras de peixe através da inibição da atividade das proteases endógenas pela quitosana.

Os valores de pH deste estudo diferiram dos obtidos por Oliveira e Sales (1988) que encontraram um valor de 7,7 no 20º dia de estocagem congelada ao estudarem as alterações de frescor do pargo, *Lutjanus purpureus* Poey (1867), durante as fases de pré e pós-processamento na indústria.

Wu (2014), ao avaliar o efeito do revestimento de quitosana na preservação do camarão branco durante o armazenamento parcialmente congelado, observou que, embora o grupo revestido com quitosana tenha apresentado um valor de pH inicial mais elevado do que o grupo controle, este último passou a apresentar valores de pH maiores após 10 dias de armazenamento, aumentando significativamente ($p < 0,01$) durante o armazenamento.

Gonçalves e Grindi Junior (2009) notaram que, durante o período de armazenamento congelado de 180 dias, o pH das amostras de camarões tratados com diferentes porcentagens de glaciamento diminuiu progressivamente com o tempo em todos os grupos estudados. Camarões tratados com maior porcentagem de glaciamento (18%) apresentaram menor valor de pH (armazenamento final), mostrando que a porcentagem pode influenciar nos valores de pH.

4.2.5 Cor

Os valores dos componentes L* (luminosidade), a* (vermelho) e b* (amarelo) foram registrados para avaliar as alterações da cor da superfície do músculo e da pele dos filés de pargo durante o armazenamento.

4.2.5.1 Cor do músculo

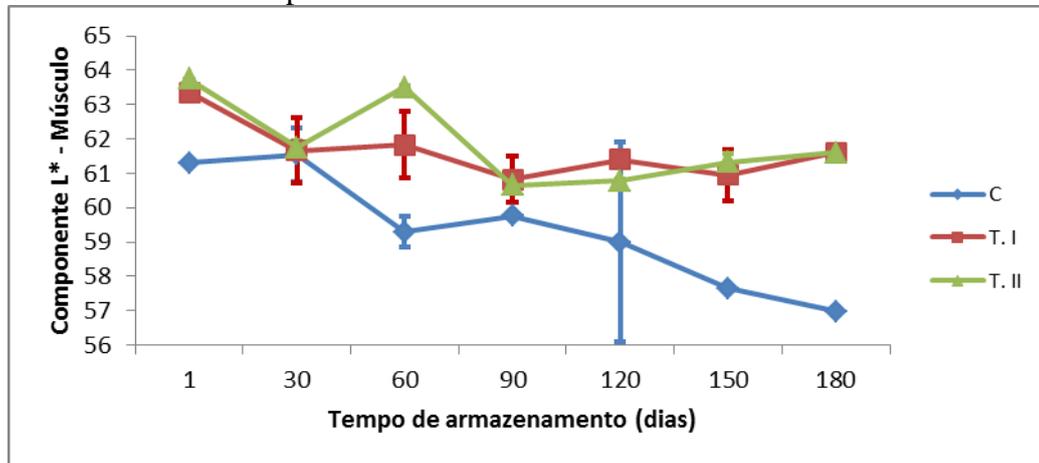
Os resultados obtidos para os componentes da cor L*, a* e b* do músculo estão apresentados nas Figuras 6, 7 e 8, respectivamente.

Com relação à luminosidade (componente L*) da cor do músculo dos filés de pargo, observou-se um declínio em todos os grupos, mostrando uma tendência ao escurecimento da carne. Esta mudança de cor pode ser causada por cristais de gelo formados durante o congelamento, o que leva a lesões mecânicas sobre as membranas celulares e a deterioração dos componentes celulares, tais como a desnaturação de proteínas (DUAN *et al*, 2010).

Duan *et al* (2010), ao avaliarem a qualidade de filés de bacalhau (*Ophiodon elongates*) revestidos com quitosana incorporada com óleo de peixe, observaram que o valor L^* de amostras de filés de bacalhau sem revestimento armazenadas congeladas diminuiu de 65,6 para 63,9 em 3 meses ($p < 0,05$), indicando um escurecimento da cor dos peixes com o período de armazenamento.

O componente L^* da cor do músculo para as amostras dos grupos Controle e Tratamento II decresceu de 61,3 para 56,98 e de 63,74 para 61,61, respectivamente, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) com o tempo de armazenamento (Figura 6). Os valores de L^* nos Tratamentos I e II não diferiram entre si ($p > 0,05$) no final do tempo analisado, no entanto, diferiram do Controle no mesmo período, apresentando, neste, valores mais baixos. Esse escurecimento mais acentuado da carne no Controle já era esperado uma vez que as amostras não receberam revestimento algum. Assim, os métodos utilizados nos Tratamentos I e II mostraram-se de alguma forma eficazes na manutenção da luminosidade do músculo do filé de pargo congelado.

Figura 6 - Componente L^* da cor do músculo de filés de pargo dos três grupos armazenados a $-18\text{ }^\circ\text{C}$ por 180 dias.



FONTE: Elaborada pela autora.

C: Controle;

T. I: Glaciado;

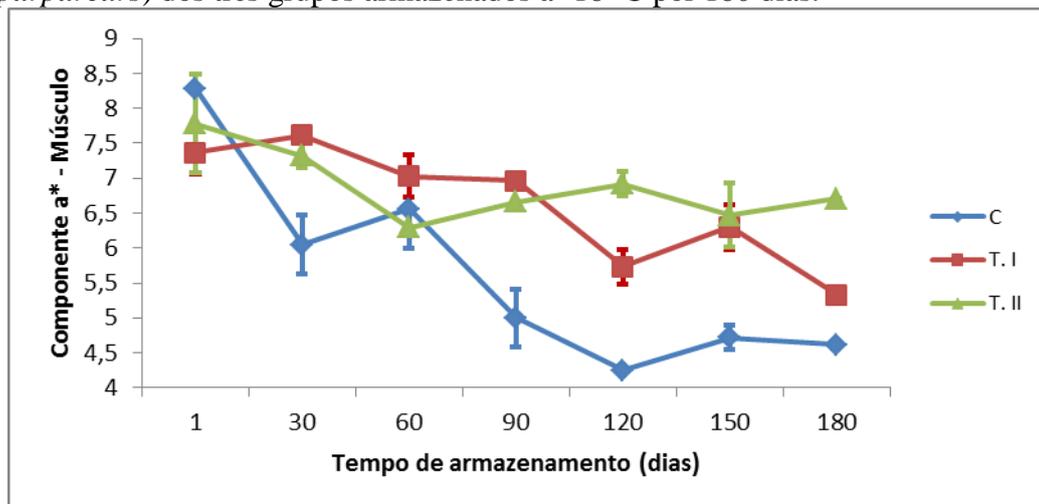
T. II: Revestido com solução de quitosana.

Solval *et al* (2014), ao trabalharem com quitosana em nanopartículas com diferentes concentrações no revestimento de camarões congelados, observaram que durante os 30 dias de armazenamento, nenhuma mudança significativa foi observada nos valores de L^* entre os grupos. Assim, o processo de glaciamento não interferiu no valor L^* em relação às amostras controle durante o período de armazenamento congelado.

O componente a^* apresentou uma mudança considerável no Controle em relação aos demais. A partir do 60º dia, esse grupo revelou um decréscimo mais acentuado do que o observado nos demais grupos, passando de um valor de 6,56 no 60º dia para 4,62 no 180º dia, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) com o tempo de armazenamento. Com relação aos Tratamentos I e II, estes também diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) com relação ao tempo de armazenamento.

Comparando-se os tratamentos, nota-se que tanto o Controle como o Tratamento I apresentaram variações maiores com relação ao Tratamento II, que se manteve mais regular. O Tratamento II passou de um valor de 7,77 para 6,71 em 180 dias de armazenamento congelado, enquanto que o Controle e o Tratamento I passaram de 8,28 para 4,62 e de 7,36 para 5,33, respectivamente, no mesmo período (Figura 7).

Figura 7 - Componente a^* da cor do músculo de filés de pargo (*Lutjanus purpureus*) dos três grupos armazenados a $-18\text{ }^\circ\text{C}$ por 180 dias.



FONTE: Elaborada pela autora.

C: Controle;

T. I: Glaciado;

T. II: Revestido com solução de quitosana.

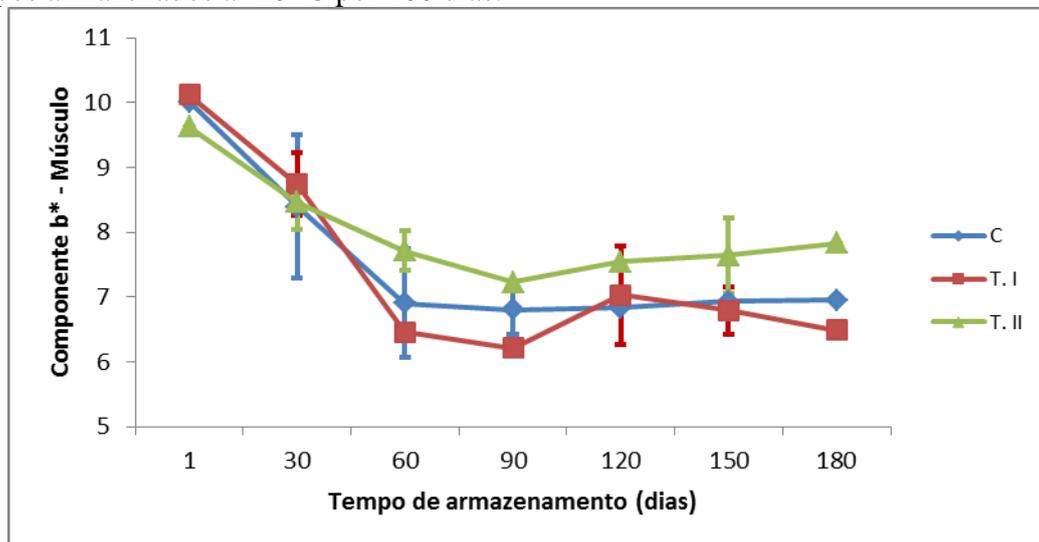
No estudo de Solval *et al* (2014) o componente a^* para os camarões revestidos com quitosana em nanopartículas não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$) em relação ao grupo controle e às amostras glaciadas após 30 dias de armazenamento congelado. Segundo os autores, a oxidação lipídica tem sido associada com a degradação da cor durante o armazenamento congelado, sendo que essa degradação em produtos congelados é muito influenciada pela temperatura de armazenamento.

Com relação ao componente b^* , aconteceram mudanças significativas ($p < 0,05$) do 1º ao último dia em todos os grupos com o passar do tempo de armazenamento. Foi observado

no componente b^* um comportamento semelhante nos três grupos, havendo um decréscimo dos valores em relação ao tempo.

No grupo Controle e no Tratamento I não houve diferença significativa ($p>0,05$) a partir do 60º dia com o decorrer do tempo de armazenamento, ou seja, mantiveram-se estáveis nesse período. No Tratamento II, esta estabilidade só passou a acontecer a partir do 90º dia (Figura 8). Através dos resultados obtidos, observou-se que as amostras do Tratamento II apresentaram as menores variações, passando de um valor inicial de 9,63 para 7,83 durante o armazenamento.

Figura 8 - Componente b^* da cor do músculo de filés de pargo (*Lutjanus purpureus*) dos três grupos armazenados a $-18\text{ }^\circ\text{C}$ por 180 dias.



FONTE: Elaborada pela autora.

C: Controle;

T. I: Glaciado;

T. II: Revestido com solução de quitosana.

Duan *et al.* (2010) observaram que a cor dos filés de bacalhau (*Ophiodon elongates*) encontrava-se amarelada, com valores de L^* maiores que 55, de a^* entre 1 e 5, e de b^* entre 8 e 16, ao avaliarem a qualidade de filés de bacalhau revestidos com quitosana incorporada com óleo de peixe. Concluíram que o revestimento, com ou sem incorporação de vitamina E, não afetou os componentes L^* , a^* e b^* das amostras de peixe armazenados congelados ($p>0,05$).

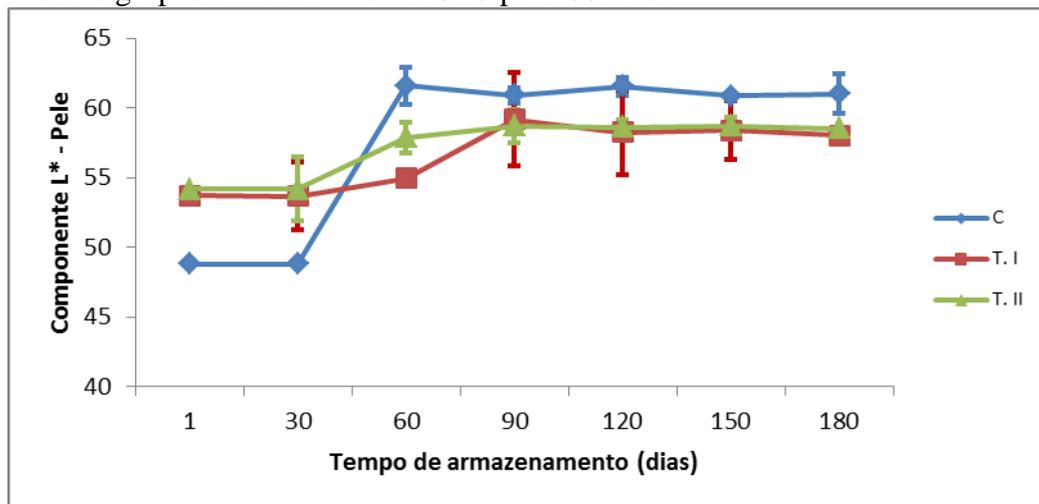
4.2.5.2 Cor da pele

Os resultados obtidos para os componentes L^* , a^* e b^* da cor da pele estão apresentados nas Figuras 9, 10 e 11, respectivamente.

Com relação à luminosidade da cor da pele (componente L*), houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no grupo Controle, a partir do 30º dia. Esse critério passou de um valor de 48,79 no 30º dia para 61,59 no 60º dia, indicando que houve um clareamento da pele, mantendo-se, a partir daí, sem alterações significativas ($p > 0,05$) até o último dia de armazenamento.

No final do período de estocagem, os Tratamentos I e II não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$), no entanto, diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) com relação ao Controle (Figura 9). Dessa forma, podemos afirmar que a pele dos filés de pargo sofreu um clareamento de sua cor em todos os grupos, sendo este mais intenso no grupo Controle desde o 60º dia de armazenamento. Isso mostrou que os revestimentos minimizaram o clareamento da pele dos filés de pargo, ocasionado pela perda da cor característica da pele desses animais, durante o período de armazenamento de 180 dias.

Figura 9 - Componente L* da cor da pele de filés de pargo (*Lutjanus purpureus*) dos três grupos armazenados a -18 °C por 180 dias.



FONTE: Elaborada pela autora.

C: Controle;

T. I: Glaciado;

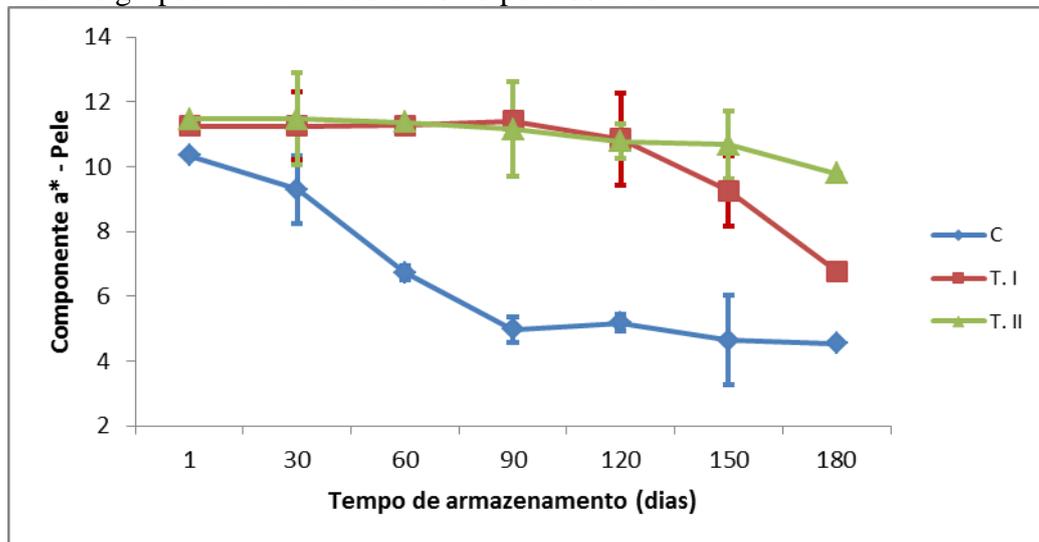
T. II: Revestido com solução de quitosana.

A cor vermelha da pele do pargo é decorrente da presença de pigmentos carotenoides, sendo a astaxantina o principal componente. A principal causa da degradação dos carotenoides nos alimentos é a oxidação, sendo que esta reação ocorre com menor ou maior severidade, dependendo das condições ambientais. No tecido intacto, a estabilidade do pigmento depende da permeabilidade da célula e da presença de componentes que a protejam (LEMOS, 1984).

Em relação ao componente a^* , os Tratamentos I e II comportaram-se de forma bastante semelhante até o 120º dia, diferindo significativamente ($p < 0,05$) no 180º dia. O Controle apresentou valores mais baixos em todos os dias analisados, diferindo significativamente ($p > 0,05$) dos Tratamentos I e II no final do período estudado. Foi perceptível a alteração na cor da pele das amostras do grupo Controle em relação aos demais a partir do 90º dia, como mostra a Figura 12. Valores elevados de a^* indicam tendência para o vermelho (SIRIPATRAWAN, HARTE, 2010).

As amostras tratadas com revestimento tanto de água (glaciadas) como de solução de quitosana mostraram alterações menores nos valores de cor da pele, provavelmente devido à proteção conferida por essas camadas. No entanto, somente as amostras do Tratamento II não diferiram significativamente ($p > 0,05$) entre o 1º e o último dia de estocagem. Isso mostra que o revestimento de quitosana foi mais eficaz que o glaciamento na proteção dos pigmentos presentes na pele contra a oxidação, apesar destes terem sido equivalentes até o 150º dia.

Figura 10 - Componente a^* da cor da pele de filés de pargo (*Lutjanus purpureus*) dos três grupos armazenados a $-18\text{ }^\circ\text{C}$ por 180 dias.



FONTE: Elaborada pela autora.

C: Controle;

T. I: Glaciado;

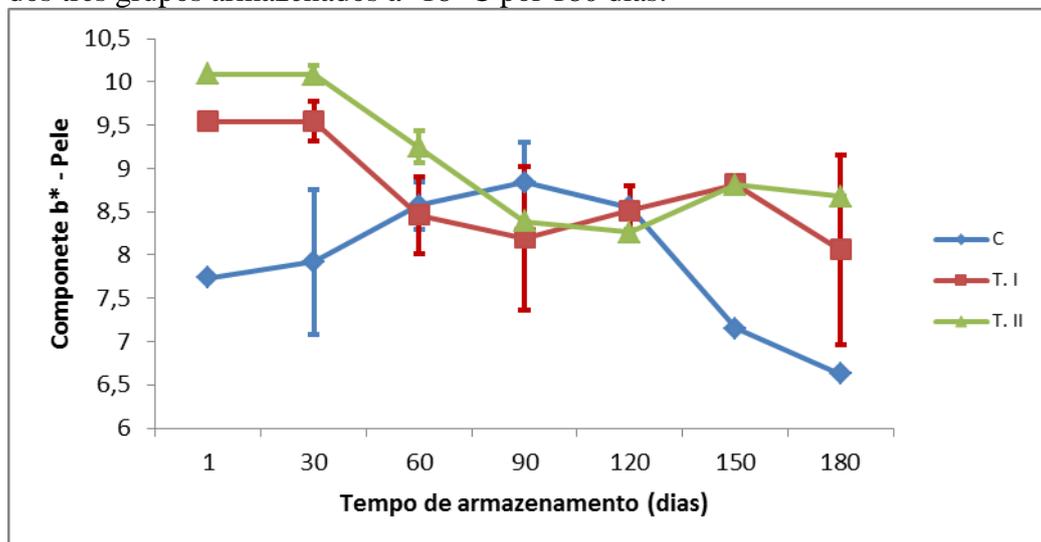
T. II: Revestido com solução de quitosana.

Devido à sua capacidade de habitar em fundos de areias ou rochas, o pargo se alimenta essencialmente de crustáceos (caranguejos e pequenos camarões), moluscos (búzios, lulas e polvos) e peixes, que são ricos em pigmentos carotenóides (astaxantina). A astaxantina exibe também funções biologicamente importantes, incluindo a proteção contra oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados essenciais e proteção contra raios U.V (ROSA, 2008).

A alteração da cor dos carotenoides causada pela oxidação compromete a qualidade sensorial dos filés de pargo congelados, influenciando diretamente na aceitação do produto por parte dos consumidores. A oxidação dos pigmentos carotenoides em peixes é favorecida pela presença do ar, luz, calor e principalmente quando esses animais marinhos sofrem traumatismos em seus órgãos durante o processo de captura (LEMOS, 1984).

Com relação ao componente b^* , observou-se que os Tratamentos I e II comportaram-se de maneira semelhante ao longo do período de armazenamento (Figura 11). O grupo Controle, por sua vez, mostrou comportamento distinto dos demais, apresentando o menor valor para tal critério no final da estocagem.

Figura 11 - Componente b^* da cor da pele de filés de pargo (*Lutjanus purpureus*) dos três grupos armazenados a $-18\text{ }^\circ\text{C}$ por 180 dias.



FONTE: Elaborada pela autora.

C: Controle;

T. I: Glaciado;

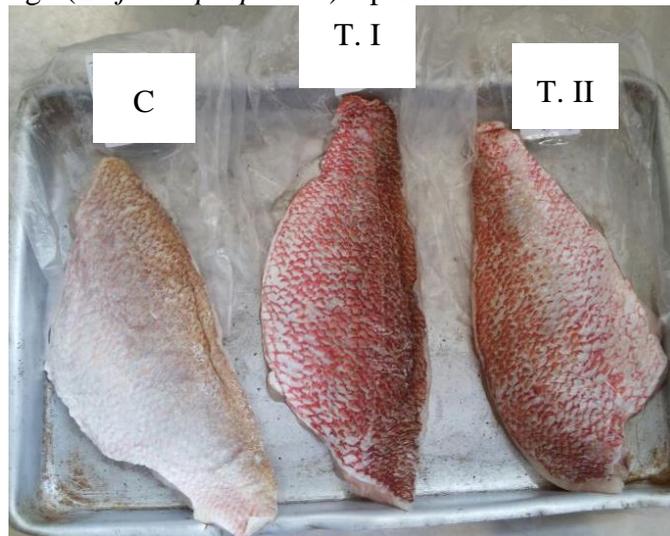
T. II: Revestido com solução de quitosana.

Doolan *et al* (2008), ao avaliarem o efeito dos carotenóides e da cor do fundo das gaiolas na pigmentação da pele do pargo (*Pagrus auratus*), encontrou valores de 71,3, 2,9 e 8,3 para os componentes L^* , a^* e b^* , respectivamente no grupo controle dos peixes da gaiola branca e 55,3, 4,5 e 8,4, respectivamente no grupo controle dos peixes colocados na gaiola preta.

Manganaro *et al* (2012), ao avaliarem a pigmentação artificial e qualidade da carne do pargo (*Pagrus pagrus*) durante oito meses, observaram que os valores médios para os componentes L^* , a^* e b^* foram 66,79, 0,22 e 1,35, respectivamente.

Kalinowski *et al* (2007), ao avaliarem efeito do tempo de suplementação dietética com farinha de casca de camarão em relação a cor da pele do pargo (*Pagrus pagrus*), utilizaram como referência dos componentes de cor da pele de pargos capturados na Ilha de Fuerteventura os valores de $69,4\pm 5,38$, $8,7\pm 3,14$ e $13,1\pm 4,25$ para L^* , a^* e b^* , respectivamente.

Figura 12 - Alteração visível da cor da pele dos filés de pargo (*Lutjanus purpureus*) a partir do 90° dia.



FONTE: Elaborada pela autora.

C: Controle;

T. I: Glaciado;

T. II: Revestido com solução de quitosana.

4.2.6 Textura instrumental

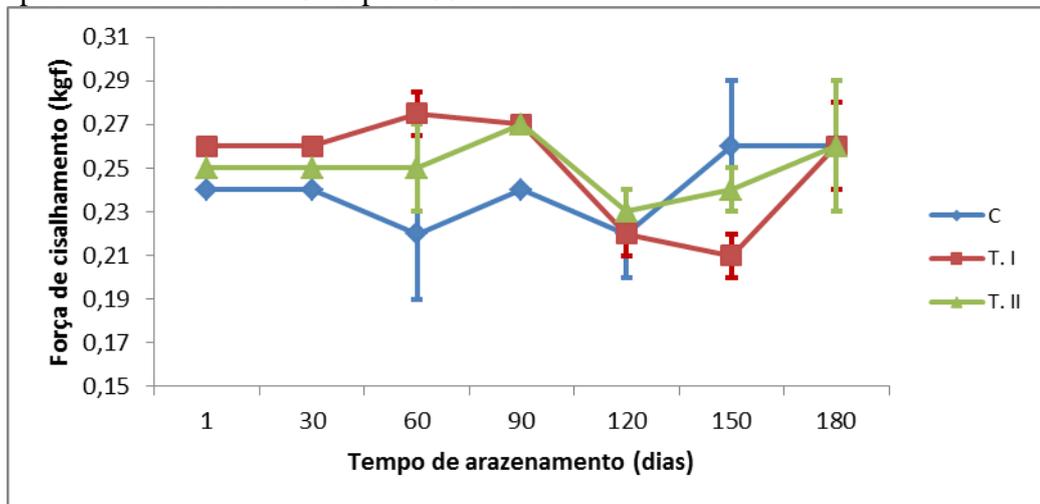
A Figura 13 apresenta os resultados da medida da força necessária para cortar os filés de pargo (força de cisalhamento). Esta análise está diretamente relacionada com a resistência do produto ao corte, portanto é usada como uma medida de dureza. A medida da textura foi utilizada para determinar a mudança estrutural do músculo do peixe no decorrer do armazenamento congelado.

Textura de peixe é um dos atributos de qualidade principal para aceitação pelos consumidores (MOHAN *et al*, 2012). Observou-se neste estudo, uma discreta diminuição da resistência ao corte em todos os grupos, no entanto esses valores não foram estatisticamente diferentes ($p>0,05$). Os resultados obtidos se mantiveram em torno de 0,2 kgf para todos os grupos do 1° ao 180° dia.

Os resultados variaram de 0,21 a 0,27 kgf para os filés de pargo dos três grupos. A análise dos dados mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$), nem com o tempo de armazenamento ($p>0,05$).

Inicialmente a textura do pescado é firme e elástica, após a morte passa pelo estágio de contração (*Rigor Mortis*), relaxamento e no estágio avançado de decomposição adquire uma consistência flácida e pastosa (FARIAS, 2006).

Figura 13 - Textura instrumental de filés de pargo (*Lutjanus purpureus*) dos três grupos armazenados a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 180 dias.



FONTE: Elaborada pela autora.

C: Controle;

T. I: Glaciado;

T. II: Revestido com solução de quitosana.

Segundo Albuquerque *et al.* (2004), a condição de estocagem do pescado é um fator bastante importante na conservação, visto que pode influenciar de forma direta nas suas propriedades de textura. Ao estudar a textura muscular da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) abatida com dióxido de carbono e armazenada em gelo, concluiu que houve diminuição desse parâmetro com relação ao tempo de armazenamento.

Abreu (2006), ao avaliar o efeito da radiação gama sobre as características sensoriais em caudas de camarões congelados, encontrou para textura instrumental do grupo controle um valor de 2,03 kgf.

4.2.7 Composição centesimal

O pescado é de extrema importância na dieta alimentar por sua riqueza de nutrientes, alto teor protéico, lipídios de excelente qualidade e baixo teor de colesterol. Um

peixe marinho bastante apreciado na cozinha nordestina é o pargo, que possui grande importância comercial, embora suas características nutricionais sejam pouco estudadas (VILA NOVA *et al*, 2005).

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados da composição centesimal no início do experimento. Os valores de lipídios encontrados no presente estudo não estavam de acordo com os encontrados por Caula, Oliveira e Maia (2008) que encontrou um teor de 1,0 % de lipídio total para filé de pargo. Esses autores, ao avaliarem o teor de colesterol e composição centesimal de algumas espécies de peixes do estado do Ceará, observaram ainda que os valores de umidade, proteína e cinza foram de 80,7 %, 18,4 % e 0,7 %, respectivamente, para o pargo (*Lutjanus purpureus*).

Tabela 4 – Composição centesimal de filés de pargo com 1 e 180 dias de armazenamento.

Tempo de armazenamento	Tratamento	Composição centesimal (%)			
		Umidade	Cinzas	Proteínas	Lipídios
1 dia	MP	80,61	0,93	17,96	0,22
	C	79,39	0,82	17,37	0,09
180 dias	T. I	80,99	0,85	16,08	0,10
	T. II	80,40	0,93	17,11	0,07

MP: Matéria-prima;

C: Controle;

T. I: Glaciado;

T. II: Revestido com solução de quitosana.

Vila Nova, Godoy e Aldrigue (2005), ao estudarem a composição química do pargo, observaram que, mesmo sendo um peixe marinho e nativo, apresentou uma composição centesimal semelhante a da tilápia quanto aos teores de umidade e cinzas. O pargo apresentou os maiores valores de proteínas e lipídios, com a umidade variando de 76,6 a 79,4%; cinzas, 1,1 a 1,3%; proteínas, 18,8 a 20,2% e lipídios 0,8 a 2,4%.

De acordo com os resultados encontrados e considerando-se a classificação de Stansby & Olcott (1967), o pargo encontram-se, então, na categoria A (peixes com baixo teor de lipídios - menos de 5 % - e alto teor de proteína - de 15 a 20 %), portanto considerados peixes de excelente qualidade nutricional.

5 CONCLUSÕES

O revestimento de quitosana proporcionou uma melhor qualidade microbiológica das amostras, sendo efetivo para impedir a multiplicação de *Pseudomonas* spp. a partir do 60º dia de armazenamento. Para *Estafilococos* coagulase positiva tanto o revestimento de quitosana como o congelamento inibiram por completo seu crescimento.

Tanto o congelamento quanto o revestimento de quitosana apresentaram uma maior proteção das amostras quanto aos teores de N-BVT com relação ao grupo Controle. Por outro lado, os revestimentos aplicados não influenciaram nos resultados obtidos de TMA.

Os valores de TBARS dos filés revestidos com quitosana foram significativamente menores quando comparados com o Controle. Os baixos teores de TBARS obtidos indicam que os revestimentos inibiram a oxidação lipídica dos filés de pargo.

Os valores de pH dos filés de pargo revestidos com quitosana apresentou-se significativamente mais baixos no final do período de armazenamento quando comparado com o grupo Controle e com as amostras congeladas.

O componente de cor a^* da pele não foi alterado nas amostras revestidas com quitosana, o que proporcionou uma melhor manutenção da coloração natural dos filés de pargo. O componente de cor L^* das amostras revestidas com quitosana não se apresentou significativamente distinto com relação às amostras congeladas. No grupo Controle, a ausência de um revestimento provocou um aumento do componente L^* , tornando a pele dos filés de pargo mais pálida quando comparada com as amostras revestidas.

Os revestimentos mostraram-se de alguma forma eficazes na manutenção da luminosidade do músculo do filé de pargo congelado, retardando o escurecimento das amostras, sendo indiferentes entre si.

Os tratamentos utilizados não alteraram significativamente a textura instrumental dos filés de pargo.

Portanto, observou-se que o revestimento dos filés de pargo com quitosana proporcionou uma melhor qualidade microbiológica do produto, impedindo a oxidação lipídica, a perda da coloração natural da pele e o aumento dos valores de pH dos filés. Dessa forma, o método pode ser eficaz para estender a vida útil.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M., REZAEI, M., FARZI, G. A novel active bionanocomposite film incorporating Rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 111, p. 343-350, 2012.
- ABREU, D.A.P., LOSADA, P.P., MAROTO, J., CRUZ, J.M. Evaluation of the effectiveness of a new active packaging film containing natural antioxidants (from barley husks) that retard lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Food Research International**, v. 43, p. 1277-1282, 2010.
- ABREU, D.A.P., LOSADA, P.P., MAROTO, J., CRUZ, J.M. Natural antioxidant active packaging film and its effect on lipid damage in frozen blue shark (*Prionace glauca*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, p. 50-55, 2011.
- ABREU, Virgínia Kelly Gonçalves. **Efeito da radiação gama sobre a redução de micro-organismos patogênicos, a estabilidade dos lipídios e as características sensoriais em caudas de camarões congelados**. Fortaleza, 2006. 77p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2006.
- AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 837-842, 2010.
- ALBUQUERQUE, W.F., ZAPATA, J.F.F., ALMEIDA, R.S. Estado de frescor, textura e composição muscular da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) abatida com dióxido de carbono e armazenada em gelo. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, p. 264 – 271, 2004.
- AOAC. Official Methods of Analysis Manual. 18. ed., **Association of Official Analytical Chemists (AOAC)** International, 2005.
- BOLSSON, Bianca Craus. **Análise do peso líquido e da quantidade de glaciamento em camarões crus descascados congelados**. Porto Alegre, 2012. 35p. Monografia (Especialização em Produção, Tecnologia e Higiene de Alimentos de Origem Animal). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2012.
- BONILLA, J., ATARÉS, L., VARGAS, M., CHIRALT, A. Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 208-213, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 1.255 de 25 de junho de 1962**.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997**.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, Brasil 2010**. Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasília, DF, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001.**

BROEKAERT, K., HEYNDRICKX, M., HERMAN, L., DEVLIEGHIERE, F., VLAEMYNCK, G. Seafood quality analysis: Molecular identification of dominant microbiota after ice storage on several general growth media. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1162-1169, 2011.

CAULA, F. C. B., OLIVEIRA, M.P., MAIA, E.L. Teor de colesterol e composição centesimal de algumas espécies de peixes do estado do Ceará. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 959 - 963, 2008.

CHAHAD, O. B., BOUR, M. E., CALO-MATA, P., BOUDABOUS, A., BARROS-VELÀZQUEZ, J. Discovery of novel biopreservation agents with inhibitory effects on growth of food-borne pathogens and their application to seafood products. **Research in Microbiology**, v. 163, p. 44-54, 2012.

CHOULIARA, I., SAVVAIDIS, I.N., PANAGIOTAKIS, N., KONTOMINAS, M.G. Preservation of salted, vacuum-packaged, refrigerated sea bream (*Sparus aurata*) fillets by irradiation: microbiological, chemical and sensory attributes. **Food Microbiology**, v. 21, p. 351-359, 2004.

CONWAY, E. J., BYRNE, A. An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances: the micro-determination of ammonia. **Biochemistry Journal**, v. 27, p. 419-429, 1933.

DALGAARD, P. **Freshness, Quality and Safety in Seafoods**. Dublin 15, Ireland, 31p., 2000.

DOOLAN, B.J., ALLAN, G.L., BOOTH, M.A., JONES, P.L. Effect of carotenoids and background colour on the skin pigmentation of Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider, 1801). **Aquaculture Research**, v. 39, p. 1423 – 1433, 2008.

DOWNES, M. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed., Washington: Ed. APHA, p. 676, 2001.

DUAN, J., CHERIAN, G., ZHAO, Y. Quality enhancement in fresh and frozen lingcod (*Ophiodon elongates*) fillets by employment of fish oil incorporated chitosan coatings. **Food Chemistry**, v. 119, p. 524–532, 2010.

ELSABEE, M.Z., ABDOU, E.S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 1819 – 1841, 2013.

FACCO, E.M.P. **Parâmetros de qualidade do charque relacionados ao efeito da suplementação de vitamina E na dieta de bovinos de raça Nelore em confinamento**. Campinas, 2002. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas – SP, 2002.

- FAN, W., SUN, J., CHEN, Y., QIU, J., ZHANG, Y., CHI, Y. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. **Food Chemistry**, v. 115, p. 66-70, 2009.
- FARIAS, Maria do Carmo Andion. **Avaliação das condições higiênico – sanitárias do pescado beneficiado em indústrias paraenses e aspectos relativos à exposição para consumo em Belém – Pará. Belém**, 2006. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Pará, Belém - PA, 2006.
- FERNÁNDEZ-SAIZ, P., SÁNCHEZ, G., SOLER, C., LAGARON, J.M., OCIO, M.J. Chitosan films for the microbiological preservation of refrigerated sole and hake fillets. **Food Control**, v. 34, p. 61 – 68, 2013.
- FERNANDEZ-SAIZ, P., SOLER, C., LAGARON, J.M., OCIO, M.J. Effects of chitosan films on the growth of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. In laboratory media and fish soup. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 287-294, 2010.
- GENNADIOS, A. Protein-based films and coatings. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p. 672, 2002.
- GIALAMAS, H., ZINOVIADOU, K.G., BILIADERIS, C.G., KOUTSOUMANIS, K.P. Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Research International**, v. 43, p. 2402-2408, 2010.
- GÓMEZ-ESTACA, J., LACEY, A.L. DE, LÓPEZ-CABALLERO, M.E., GÓMEZ-GUILLÉN, M.C., MONTERO, P. Biodegradable gelatina-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. **Food Microbiology**, v. 27, p. 889-896, 2010.
- GONÇALVES, A. A., GINDRI JUNIOR, C.S.G. The effect of glaze uptake on storage quality of frozen shrimp. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 285-290, 2009.
- GRAM, L., HUSS, H. H. Microbiological spoilage of fish and fish products. **Food Microbiology**, v. 33, p. 121-137, 1996.
- HOSSEINI, S.F., REZAEI, M., ZANDI, M., GHAVI, F.F. Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1490-1495, 2013.
- ITURRIAGA, L., OLABARRIETA, I., MARAÑÓN, I.M. DE. Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, p. 58-64, 2012.
- KALINOWSKI, C.T., IZQUIERDO, M. S., SCHUCHARDT, D., ROBAINA, L. E. Dietary supplementation time with shrimp shell meal on red porgy (*Pagrus pagrus*) skin colour and carotenoid concentration. **Aquaculture**, v. 272, p. 451 – 457, 2007.

KANATT, S.R., RAO, M. S., CHAWLA, S.P., SHARMA, A. Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 29, p. 290-297, 2012.

KILINCCEKER, O., DOGAN, I. S., KUCUKONER, E. Effect of edible coatings on the quality of frozen fish fillets. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, p. 868-873, 2009.

KUORWEL, K. K, CRAN, M. J., SONNEVELD, K., MILTZ, J., BIGGER, S.W. Migration of antimicrobial agents from starch-based films into a food simulant. **LWT – Food Science and Technology**, v. 50, p. 432-438, 2013.

LEMOS, Luiz Carlos Pereira. **Estudo dos pigmentos carotenoides que ocorrem na pele do pargo (*Lutjanus purpureus* Poey)**. Fortaleza, 1984. 56p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Departamento Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE, 1984.

LI, T. T., LI, J. R., HU, W. Z., ZHANG, X. G., LI, X. P., ZHAO, J. Shelf-life extension on crucian carp (*Carassius auratus*) using natural preservatives during chilled storage. **Food Chemistry**, v. 135, p. 140–145, 2012¹.

LI, T., LI, J., HU, W., LI, X. Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives. **Food Chemistry**, v. 138, p. 821–826, 2013.

LI, T.T., HU, W.Z., LI, J.R., ZHANG, X.G., ZHU, J.L., LI, X.P. Coating effects of tea polyphenol and rosemary extract combined with chitosan on the storage quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). **Food Control**, v. 25, p. 101–106, 2012².

LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C., GÓMEZ-ESTACA, J., CATALÁ, R., GAVARA, R., HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1376-1384, 2012.

LOUKAS, V., DIMIZAS, C., SINANOGLU, V.J., MINIADIS-MEIMAROGLOU, S. EPA, DHA, cholesterol and phospholipid content in *Pagrus pagrus* (cultured and wild), *Trachinus draco* and *Trigla lyra* from Mediterranean Sea. **Chemistry and physics of lipids**, v. 163, p. 292-299, 2010.

MACÉ, S., CORNET, J., CHEVALIER, F., CARDINAL, M., PILET, M.F., DOUSSET, X., JOFFRAUD, J.J. Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo salar*) steaks stored under vacuum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR-TTGE. **Food Microbiology**, v. 30, p. 164-172, 2012.

MANGANARO, A., SANFILIPPO, M., FORTINO, G., DAPRÀ, F., PALMEGIANO, G.B., GAI, F., LEMBO, E., REALE, A., ZIINO, M. Artificial pigmentation and flesh quality in red porgy (*Pagrus pagrus*). **International Aquatic Research**, p. 4 – 15, 2012.

MOHAN, C.O., RAVISHANKAR, C.N., LALITHA, K.V., SRINIVASA GOPAL, T.K. Effect of chitosan edible coating on the quality of double filleted Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*) during chilled storage. **Food Hydrocolloids**, v. 26, p. 167-174, 2012.

- MOL, S., ERKAN, N., ÜÇOK, TOSUN, D. S.Y. Effect of psychrophilic bacteria to estimate fish quality. **Journal of Muscle Foods**, v. 18, p. 120 – 128, 2007.
- NÚÑEZ-FLORES, R., GIMÉNEZ, B., FERNÁNDEZ-MARTÍN, F., LÓPEZ-CABALLERO, M.E., MONTERO, M.P., GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. Role of lignosulphonate in properties of fish gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 60-71, 2012.
- OCAÑO-HIGUERA, V.M., MARQUEZ-RÍOS, E., CANIZALES-DÁVILA, M., CASTILLO-YÁÑEZ, F.J., PACHECO-AGUILAR, R., LUGO-SÁNCHEZ, M.E., GARCÍA-OROZCO, K.D., GRACIANO-VERDUGO, A.Z. Postmortem changes in cazon fish muscle stored on ice. **Food Chemistry**, v. 116, p. 933-938, 2009.
- OJAGH, S.M., REZAEI, M., RAZAVI, S.H., HOSSEINI, S.M.H. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. **Food Chemistry**, v. 120, p. 193–198, 2010.
- OLIVEIRA, J.C., SALES, R.O. Estudo das alterações de frescor do pargo, *Lutjanus purpureus* Poey (1867), durante as fases de pré e pós-processamento na indústria. **Ciência Agrônômica**, v. 19, p. 153-160, 1988.
- PARLAPANI, F.F., MEZITI, A., KORMAS, K.A., BOZIARIS, I.S.. Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis. **Food Microbiology**, v. 33, p. 85-89, 2013.
- PAVLATH, A. E.; ORTS, W. Edible Films and Coatings: Why, What, and How? In: EMBUSCADO, M. E; HUBER, K. C. **Edible Films and Coatings for Food Applications**. New York: Springer, p. 1-23, 2009.
- PEREDA, M., PONCE, A.G., MARCOVICH, N.E., RUSECKAITE, R.A., MARTUCCI, J.F. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1372-1381, 2011.
- QIU, X., CHEN, S., LIU, G., YANG, Q. Quality enhancement in the Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicas*) fillets stored at 4 °C by chitosan coating incorporated with citric acid or licorice extract. **Food Chemistry**, v. 162, p. 156 – 160, 2014.
- RAHAYO, S., SOFOS, J.N., SCHMIDT, G.R. Improved speed, specificity and limit of determination of aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C₁₈ method for measuring lipid peroxidation in beef. **Journal and Agricultural and Chemistry**, v. 40, p. 2182-2185, 1992.
- RAO, M.S., KANATT, S.R., CHAWLA, S.P., SHARMA, A. Chitosan and guar gum composite films: Preparation, physical, mechanical and antimicrobial properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 1243 – 1247, 2010.
- RESENDE, S.M., FERREIRA, B.P., FREDOU, T. A pesca de Lutjanídeos no nordeste do Brasil: Histórico das pescarias, características das espécies e relevância para o manejo. **Boletim Técnico-Científico do CEPENE**, v. 11, p. 257-270, 2003.

RODRIGUEZ-TURIENZO, L., COBOS, A., DIAZ, O. Effects of edible coatings based on ultrasound-treated whey proteins in quality attributes of frozen Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 14, p. 92–98, 2012.

RODRIGUEZ-TURIENZO, L., COBOS, A., MORENO, V., CARIDE, A., VIEITES, J.M., DIAZ, O. Whey protein-based coatings on frozen Atlantic salmon (*Salmo salar*): Influence of the plasticiser and the moment of coating on quality preservation. **Food Chemistry**, v. 128, p. 187 – 194, 2011.

ROSA, Inês Viana. **Efeitos da alta densidade e jejum nas modificações do metabolismo intermediário do pargo (*Pagrus pagrus*)**. Faro, 2008. 77p. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Biológica). Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, Universidade do Algarve, Puerto Real, Espanha, 2008.

SAAD, C.D.R., LUQUE, J.L. Larvas de Anisakidae na musculatura do pargo, *Pagrus pagrus*, no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 71-73, 2009.

SALGADO, R.L., COSTA, J.C.B., CONDE JÚNIOR, C.A., FERNÁNDEZ, M., FREITAS, M.Q., MANO, S.B. Effects of modified atmosphere packaging on microbiological, chemical and sensory changes of pargo (*Pagrus pagrus*). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.13, p. 94-97, 2006.

SANTOS, Ana Paula Billar dos. **Índices químicos, sensoriais e microbiológicos para avaliação do frescor de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) armazenada em gelo**. Pirassununga, 2011. 95p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga - SP, 2011.

SIRIPATRAWAN, U., HARTE, B.R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 770-775, 2010.

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

SONG, Y., LIU, L., SHEN, H., YOU, J., LUO, Y. Effect of sodium alginate-based edible coating containing different anti-oxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*Megalobrama amblycephala*). **Food Control**, v. 22, p. 608 – 615, 2011.

STANSBY, M. E.; OLCOTT, H. S. Composición del pescado. In: STANSBY, M. E.; DASSOW, J. A. **Tecnología de la Industria Pesquera**. Zaragoza: Acribia, p. 391 - 402, 1967.

SUPPAKUL, P., MILTZ, J., SONNEVELD, K., BIGGER, S.W. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 408-420, 2003.

TIMÓTEO, Viriato Manuel Freitas Andrade. **Reprodução de pargo (*Pagrus pagrus*, Linnaeus, 1758) em cativeiro – Avaliação da qualidade das posturas**. Porto, 2007. 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Mar e Recursos Marinhos). Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Portugal, 2007.

TONGNUANCHAN, P., BENJAKUL, S., PRODPRAN, T. Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1571-1579, 2012.

VANHAECKE, L., VERBEKE, W., BRADANDER, H.F.D. Glazing of frozen fish: Analytical and economic challenges. **Analytica Chimica Acta**, v. 672, p. 40-44, 2010.

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

VILA NOVA, C.M.V.M., GODOY, H.T., ALDRIGUE, M.L. Composição química, teor de colesterol e caracterização dos lipídios totais de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pargo (*Lutjanus purpureus*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, p. 430-436, 2005.

WALLACE, H. A.; HAMMACK, T. S. *Salmonella*. In: U.S. Food and Drugs Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. **Bacteriological Analytical Manual online**. FDA/CFSAN, 2009.

WOYEWODAL, A.D., SHAWL, S.J., KE, P.J., BURNS, B.G. **Recommended Laboratory Methods for Assessment of Fish Quality**. Nova Scotia, Canadá, 143p., 1986.

WU, S. Effect of chitosan-based edible coating on preservation of whiteshrimp during partially frozen storage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 325–328, 2014.

YE, M., NEETOO, H., CHEN, H. Effectiveness of chitosan-coated plastic films incorporating antimicrobial in inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, p. 235-240, 2008.

ZHOU, R., LIU, Y., XIE, J., WANG, X. Effects of combined treatment of electrolysed water and chitosan on the quality attributes and myofibril degradation in farmed obscure puffer fish (*Takifugu obscurus*) during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1660–1666, 2011.