



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

ANA IRENE MARTINS DA SILVA

**FILMES E REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS DE QUITOSANA E ÓLEOS
ESSENCIAIS NA QUALIDADE DE CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* CONGELADO**

FORTALEZA

2018

ANA IRENE MARTINS DA SILVA

FILMES E REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS DE QUITOSANA E ÓLEOS ESSENCIAIS
NA QUALIDADE DE CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* CONGELADO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos à obtenção do Título de Doutor em Engenharia de Pesca. Área de Concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S578f Silva, Ana Irene Martins da.
Filmes e Revestimentos Comestíveis de Quitosana e Óleos Essenciais na Qualidade de Camarão
Litopenaeus vannamei Congelado / Ana Irene Martins da Silva. – 2018.
168 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza.

1. Biopolímero. 2. Compostos voláteis. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Frescor. I. Título.

CDD 639.2

ANA IRENE MARTINS DA SILVA

FILMES E REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS DE QUITOSANA E ÓLEOS ESSENCIAIS
NA QUALIDADE DE CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* CONGELADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Engenharia de Pesca. Área de Concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Aprovada em: 23/03/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza (Orientador)
Departamento de Engenharia de Pesca (UFC)

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva
Departamento de Bioquímica (UFC)

Prof^a. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes
Departamento de Engenharia de Pesca (UFC)

Prof. Dr. Reynaldo Amorim Marinho
Departamento de Engenharia de Pesca (UFC)

Dra. Fábيا Karine Andrade
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

A minha querida mãe Ester (in memoriam), pelo que acreditou em mim, se cheguei até aqui foi graças ao seu exemplo de profissionalismo, honestidade, dignidade e bondade. A lembrança do seu amor ficará para sempre em meu coração, esta realização é nossa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ser minha fortaleza e amparo para superar tantos obstáculos, me dando força, saúde, coragem e determinação. Obrigada por amenizar os meus defeitos, enriquecer os meus valores e aumentar a minha fé.

Aos meus pais Ester (in memoriam) e Vicente pelo amor, incentivo, educação, caráter para seguir em frente apesar das dificuldades e tirar sempre uma lição dos acontecimentos ao meu redor.

A minha prima e madrinha Ana Lourdes pelo carinho e apoio durante grande parte de minha vida estudantil, sem o seu incentivo ao longo dos anos não teria alcançado este objetivo.

Aos meus primos Sandra, Silvio e Erica pelo convívio, amizade e auxílio em momentos cruciais da minha vida.

Ao Prof. Bartolomeu Warlene Silva de Souza, pela atenção, disponibilidade, compromisso, excelente orientação (valiosa contribuição para enriquecimento do trabalho) e acolhida no laboratório desde a seleção do Doutorado.

Ao Prof. Masayoshi Ogawa um exemplo de pesquisador pela orientação (Graduação e Mestrado) atenção, apoio e conhecimentos adquiridos que foram primordiais em grande parte de minha vida acadêmica. O meu muito obrigado também se estende a sua esposa Norma Barreto Perdigão Ogawa, ambos tem papel fundamental na minha vida.

A Prof^ª. Maria Lúcia Nunes (in memoriam) uma grande mulher que me ensinou muito durante boa parte de minha vida acadêmica. Muito obrigada por tudo, seus ensinamentos foram essenciais para a conclusão da minha Graduação e Mestrado e me acompanharão na vida.

Ao Prof. Everardo Lima Maia pelos ensinamentos transmitidos, apoio e principalmente disponibilidade que foram fundamentais para a conclusão da minha Graduação.

Ao Prof. Men de Sá pela disponibilidade e apoio inestimável na realização das análises na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

A Prof^a. Elizabeth Mary Cunha da Silva e os técnicos de laboratório Luiz Bitu, Rozelúcia Barroso e Janevane Castro pela assistência primorosa nas análises de frescor.

À Prof^a. Oscarina Viana de Sousa pela disponibilidade, atenção, confiança e suporte indispensáveis nas análises de atividade antimicrobiana.

Aos professores integrantes da banca examinadora André Luis Coelho da Silva, Reynaldo Amorim Marinho, Francisca Gleire Rodrigues de Menezes (minha amiga de infância) e Fábica Karine Andrade pela atenção, disponibilidade e sugestões valiosas que serviram para enriquecer o trabalho de pesquisa.

Aos integrantes do Laboratório de Tecnologia da Biomassa André Luís Pereira e Eden Batista Duarte pela disponibilidade e ajuda imprescindível na realização da caracterização mecânica dos filmes comestíveis.

A todos que compuseram o LATEPE durante os anos de Doutorado, em especial os Amigos (Jessyca Marinara, Natália Dutra, Diego Alves, Jakson Martins, Cybele Guimarães, Fellipy Augusto, Cláudia Brandão, Lyndervan Alcântara, Manuella Vidal e Ivanildo) e Colegas (Lorena Almeida, Mayra Horácio, Beatriz Cajazeiras, Andressa Pâmela, Lorena Leite, Jaqueline Matos, Fabrícia Quaresma, Rayanne Claudino, Dulce Gabriela, Fábio Marcel, Alinne Rodrigues, Fernando, Laekson, Wedja, Cleber, Jefferson, Larissa, Célio, Lícia, Cleiton e seu Bruno) pela atenção, incentivo, companheirismo, dias felizes e apoio tão precioso.

Aos amigos de longa data, em especial Janaína Barreto, Maysa Gadelha, Francisco Walber, Antônio Neto, Cláudia Cinthia, Luciana Kelly e Ana Karine pela amizade, carinho, cumplicidade e contribuição direta ou indireta na minha trajetória e apoio as minhas escolhas.

Aos amigos que conheci no Doutorado Lana Leite, Rafael Rocha e Luan Icaro pela amizade, incentivo e disposição em ajudar nas muitas vezes que precisei.

A secretária da Pós-graduação Rogéria Setubal, pela atenção e ajuda tão prestativa durante minha trajetória na Pós-graduação em Engenharia de Pesca.

A todos os Amigos e Colegas da Engenharia de Pesca pela convivência e apoio durante os anos de Graduação e Pós-graduação.

A FUNCAP e CAPES pela concessão das bolsas de estudo.

E finalmente, a todos os parentes, amigos e colegas que mesmo não citados ajudaram e torceram de alguma forma pelo meu sucesso.

RESUMO

As novas tendências do mercado consumidor levaram o setor alimentício a concentrar esforços no desenvolvimento de filmes e revestimentos comestíveis a base de polímeros naturais em substituição às embalagens plásticas convencionais. Os filmes e revestimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais podem ser uma excelente alternativa para manter a qualidade e frescor do camarão durante armazenamento. O presente estudo teve por objetivo avaliar as propriedades físicas e mecânicas de filmes à base de quitosana e óleos essenciais (cravo, hortelã, limão, louro, manjeriço e tangerina), as potencialidades antimicrobianas dos revestimentos dos mesmos componentes dos filmes, além de avaliar a eficácia dos revestimentos de quitosana e óleos essenciais de limão e tangerina em camarão (*Litopenaeus vannamei*) congelado através de análises químicas, físico-químicas e microbiológicas. Os filmes foram caracterizados quanto à solubilidade, permeabilidade ao vapor de água (PVA), cor, opacidade, resistência à tração, alongação na ruptura e módulo de elasticidade e apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos. A atividade antimicrobiana dos revestimentos foi testada frente a quatro cepas padrões de bactérias e todos os revestimentos apresentaram ação antimicrobiana. Foram realizadas análises de composição química, pH, bases voláteis totais (BVT), trimetilamina (TMA), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e microbiológicas (contagem total de bactérias mesófilas e psicrófilas), *Vibrio* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes em amostras de camarão submetidas a cinco tratamentos: controle (C), congelamento (G), revestimento de quitosana (Q), revestimento de quitosana + óleo essencial de tangerina (QT) e revestimento de quitosana + óleo essencial de limão (QL) durante 180 dias de armazenamento. Os valores de pH, TBARS, BVT e TMA das amostras de camarão apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos. As amostras revestidas (Q, QT e QL) apresentaram as menores contagens de bactérias mesófilas e psicrófilas. *Vibrio* spp. em todos os tratamentos apresentou contagens abaixo da legislação vigente. E coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva os tratamentos C e G apresentaram valores acima da legislação. Os filmes e revestimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais apresentaram boas propriedades físicas e antimicrobianas e podem ser utilizados para manter a qualidade de camarão congelado devido à sua natureza não tóxica, biodegradável e atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Biopolímero. Compostos voláteis. Atividade antimicrobiana. Frescor.

ABSTRACT

New consumer market trends have led the food industry to focus on the development of natural polymer-based edible films and coatings instead of conventional plastic packaging. Thus the films and edible coatings of chitosan and essential oils can be an excellent alternative to maintain the quality and freshness of the shrimp during storage. The aim of this study was to evaluate the physical and mechanical properties of films based on chitosan and essential oils (clove, Peppermint, lemon, laurel, basil and tangerine), the antimicrobial potential of coatings of the same components of the films, and to evaluate the efficacy of chitosan coatings and essential oils in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) frozen through chemical, physicochemical and microbiological analyzes. The films were characterized in terms of solubility, water vapor permeability (WVP), color, opacity, tensile strength, elongation at break and elastic modulus and they presented significant differences ($p < 0.05$) between the treatments. The antimicrobial activity of the coatings was tested against four standard strains of bacteria and all the coatings presented antimicrobial action. Analyzes of chemical composition, pH, total volatile bases (TVB), trimethylamine (TMA), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and microbiological (total mesophilic and psychrotrophic counts bacteria), *Vibrio* spp., coagulase positive *Staphylococcus* and thermotolerant coliforms were carried out in shrimp samples submitted to five treatments: control (C), glazing (G), chitosan coating (Q), chitosan coating + tangerine essential oil (QT) and chitosan coating + lemon essential oil (QL) during 180 days of storage. The pH, TBARS, TVB and TMA values of the shrimp samples presented significant differences ($p < 0.05$). Coated samples (Q, QT and QL) showed the counts lowest of mesophilic and psychrotrophic bacteria. In all treatments, *Vibrio* spp. presented counts under the current legislation. For thermotolerant coliforms and coagulase positive *Staphylococcus* the C and G treatments presented values above the legislation. Films and edible coatings of chitosan and essential oils have good physical and antimicrobial properties and can be used to maintain the quality of frozen shrimp because of their non-toxic, biodegradable nature and antimicrobial activity.

Keywords: Biopolymer. Volatile compounds. Antimicrobial activity. Freshness.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química da quitina e da quitosana.....	22
Quadro 1 – Principais aplicações da quitosana.....	23
Figura 2 – Representação tridimensional de cor Hunter Lab.....	29
Figura 3 – Camarão marinho <i>Litopenaeus vannamei</i>	36
Figura 4 – Quitosana em pó utilizada nos filmes e revestimentos comestíveis.....	44
Figura 5 – Óleos essenciais utilizados nos filmes e revestimentos comestíveis.....	45
Quadro 2 – Descrição dos revestimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais produzidos em laboratório.....	47
Figura 6 – Dessecador para acondicionamento das células de permeação (a) e a célula de permeação com filme de quitosana (b).....	48
Figura 7 – Prensa estampadora pneumática utilizada para corte dos filmes (corpos de prova).....	49
Figura 8 – Vista geral do EMIC (a) e o corpo de prova acoplado ao equipamento (b)....	50
Figura 9 – Fluxograma da atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais - técnica de difusão em ágar.....	53
Figura 10 – Resultados da atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis de quitosana frente a quatro cepas padrões bacterianas.....	78
Figura 11 – Resultados da atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis de quitosana com óleos essenciais frente à cepa de <i>E. coli</i>	79
Figura 12 – Resultados da atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis de quitosana com óleos essenciais frente à cepa de <i>S. aureus</i>	80
Figura 13 – Resultados da atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis de quitosana com óleos essenciais frente à cepa de <i>Salmonella enterica</i>	81
Figura 14 – Resultados da atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis de quitosana com óleos essenciais frente à cepa de <i>V. parahaemolyticus</i>	82
Figura 15 – Processamento dos camarões <i>Litopenaeus vanammei</i> em laboratório.....	94

Figura 16 – Fluxograma do processamento de camarões <i>Litopenaeus vanammei</i> em laboratório.....	94
Figura 17 – Acondicionamento das amostras de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i> em bandejas de isopor.....	95
Quadro 3 – Tratamentos utilizados nas amostras de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i>	95
Figura 18 – Camarões <i>Litopenaeus vanammei</i> congelados para aplicação dos revestimentos.....	96
Figura 19 – Aplicação dos revestimentos por imersão em camarões <i>Litopenaeus vanammei</i> congelados.....	96
Figura 20 – Aplicação do glaciamento (a) e procedimento de drenagem (b) em camarões <i>Litopenaeus vanammei</i> congelados.....	97
Figura 21 – Fluxograma das análises de contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis nas amostras de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i>	104
Figura 22 – Fluxograma das análises de <i>Vibrio</i> spp. nas amostras de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i>	105
Figura 23 – Fluxograma das análises de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva nas amostras de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i>	106
Figura 24 – Fluxograma das análises de coliformes termotolerantes nas amostras de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i>	107
Figura 25 – Perda de peso em amostras de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i> congelado do tratamento controle durante 180 dias de estocagem.....	111
Figura 26 – Perda de revestimentos e glaciamento em amostras de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i> congelado durante 180 dias de estocagem.....	112
Figura 27 – Valores médios de pH das amostras de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i> congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.....	117
Figura 28 – Valores médios de N-BVT das amostras de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i> congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.....	119

Figura 29 – Valores médios de N-TMA das amostras de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i> congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.....	121
Figura 30 – Valores médios de TBARS das amostras de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i> congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.....	124
Figura 31 – Contagem de bactérias mesófilas (Log UFC/g) das amostras de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i> congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.....	129
Figura 32 – Contagem de bactérias psicotróficas (Log UFC/g) das amostras de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i> congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Valores de pH (média \pm desvio padrão) dos revestimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais produzidos em laboratório.....	55
Tabela 2	– Valores de solubilidade (média \pm desvio padrão) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.....	56
Tabela 3	– Valores de permeabilidade ao vapor de água (média \pm desvio padrão) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.....	58
Tabela 4	– Valores de espessura (média \pm desvio padrão) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.....	60
Tabela 5	– Valores de resistência à tração (média \pm desvio padrão) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.....	62
Tabela 6	– Valores de alongação na ruptura (média \pm desvio padrão) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.....	62
Tabela 7	– Valores de módulo de elasticidade (média \pm desvio padrão) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.....	63
Tabela 8	– Valores do parâmetro cromático L* (média \pm desvio padrão) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.....	67
Tabela 9	– Valores do parâmetro cromático a* (média \pm desvio padrão) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.....	67
Tabela 10	– Valores do parâmetro cromático b* (média \pm desvio padrão) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.....	68
Tabela 11	– Valores de opacidade (média \pm desvio padrão) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.....	71
Tabela 12	– Atividade antimicrobiana (média \pm desvio padrão) de óleos essenciais (cravo, hortelã, limão, louro, manjeriço e tangerina) frente a quatro cepas bacterianas.....	73
Tabela 13	– Atividade antimicrobiana (média \pm desvio padrão) dos revestimentos comestíveis frente à cepa padrão de <i>Escherichia coli</i> ATCC – 25922.....	75

Tabela 14	– Atividade antimicrobiana (média ± desvio padrão) dos revestimentos comestíveis frente à cepa padrão de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC – 25923.....	76
Tabela 15	– Atividade antimicrobiana (média ± desvio padrão) dos revestimentos comestíveis frente à cepa padrão de <i>Salmonella enterica</i> ATCC - 13076....	76
Tabela 16	– Atividade antimicrobiana (média ± desvio padrão) dos revestimentos comestíveis frente à cepa padrão de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> IOC – 18950.....	77
Tabela 17	– Taxa de absorção de revestimentos e glaciamento (média ± desvio padrão) em amostras de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i> congelado.....	109
Tabela 18	– Composição química (média ± desvio padrão) das amostras de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i> congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.....	114
Tabela 19	– Contagem de bactérias mesófilas e psicotróficas das amostras de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i> congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.....	128
Tabela 20	– Análises de <i>Vibrio</i> spp., <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva e coliformes termotolerantes das amostras de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i> congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS

APHA	<i>American Public Health Association</i>
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
OEs	Óleos Essenciais
IOC	Instituto Osvaldo Cruz
ICMS	<i>International Commission on Microbiological Specifications</i>
NMP	Número Mais Provável
PVA	Permeabilidade ao Vapor de Água
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UR	Umidade Relativa

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
1.1	Aspectos da quitina e da quitosana.....	21
1.2	Óleos essenciais.....	23
1.3	Filmes e revestimentos comestíveis utilizados como embalagem.....	25
1.4	Propriedades dos filmes comestíveis.....	27
1.4.1	<i>Solubilidade em água.....</i>	<i>27</i>
1.4.2	<i>Permeabilidade ao vapor de água.....</i>	<i>27</i>
1.4.3	<i>Propriedades mecânicas.....</i>	<i>28</i>
1.4.4	<i>Cor e opacidade.....</i>	<i>28</i>
1.5	Aplicação de filmes e revestimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais em pescado.....	29
1.6	Atividade antimicrobiana da quitosana e óleos essenciais.....	30
1.7	Qualidade e frescor do pescado.....	34
1.8	Informações gerais sobre o camarão.....	36
1.8.1	<i>Camarão marinho - <i>Litopenaeus vannamei</i>.....</i>	<i>36</i>
1.8.2	<i>Camarão como alimento.....</i>	<i>37</i>
2	FILMES E REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS DE QUITOSANA E ÓLEOS ESSENCIAIS.....	38
2.1	Introdução.....	40
2.2	Objetivos.....	43
2.2.1	<i>Objetivo geral.....</i>	<i>43</i>
2.2.2	<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>43</i>
2.3	Material e métodos.....	44
2.3.1	<i>Materiais para produção de revestimentos e filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.....</i>	<i>44</i>
2.3.2	<i>Preparação dos revestimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais....</i>	<i>45</i>
2.3.3	<i>Preparação dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.....</i>	<i>45</i>
2.3.4	<i>Descrição dos revestimentos e filmes comestíveis.....</i>	<i>46</i>
2.3.5	<i>Propriedades dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.....</i>	<i>48</i>
2.3.5.1	<i>Solubilidade em água.....</i>	<i>48</i>
2.3.5.2	<i>Permeabilidade ao vapor de água e espessura.....</i>	<i>48</i>

2.3.5.3	<i>Propriedades mecânicas.....</i>	49
2.3.5.4	<i>Cor e opacidade.....</i>	51
2.3.6	<i>Atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais.....</i>	51
2.3.6.1	<i>Cepas bacterianas.....</i>	51
2.3.6.2	<i>Inóculos bacterianos e a técnica de difusão em ágar.....</i>	52
2.3.7	<i>Análise estatística.....</i>	54
2.4	Resultados e discussão.....	55
2.4.1	<i>Potencial hidrogeniônico (pH) dos revestimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais.....</i>	55
2.4.2	<i>Solubilidade, permeabilidade ao vapor de água e espessura dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.....</i>	56
2.4.3	<i>Propriedades mecânicas dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.....</i>	61
2.4.4	<i>Cor e opacidade dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.....</i>	66
2.4.5	<i>Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.....</i>	72
2.4.6	<i>Avaliação da atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais.....</i>	75
2.5	Conclusões.....	87
3	REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS DE QUITOSANA E ÓLEOS ESSENCIAIS PARA CAMARÃO <i>Litopenaeus vanammei</i> CONGELADO.	88
3.1	Introdução.....	90
3.2	Objetivos.....	92
3.2.1	<i>Objetivo geral.....</i>	92
3.2.2	<i>Objetivos específicos.....</i>	92
3.3	Material e métodos.....	93
3.3.1	<i>Preparação dos revestimentos e glaciamento.....</i>	93
3.3.2	<i>Matéria-prima.....</i>	93
3.3.3	<i>Tratamentos utilizados nas amostras de camarão.....</i>	95
3.3.4	<i>Aplicação dos revestimentos e glaciamento nas amostras de camarão congelado.....</i>	95
3.3.5	<i>Taxa de absorção (revestimentos e glaciamento), perda de peso, perda de revestimento e perda de glaciamento.....</i>	97

3.3.5.1	<i>Taxa de absorção de revestimento e glaciamento</i>	97
3.3.5.1.1	<i>Taxa de absorção de revestimento</i>	97
3.3.5.1.2	<i>Taxa de absorção de glaciamento</i>	98
3.3.5.2	<i>Perda de peso</i>	98
3.3.5.3	<i>Perda de revestimento</i>	98
3.3.5.4	<i>Perda de glaciamento</i>	98
3.3.6	<i>Análises químicas, físico-químicas e microbiológicas</i>	99
3.3.6.1	<i>Composição química</i>	99
3.3.6.1.1	<i>Umidade</i>	99
3.3.6.1.2	<i>Cinzas</i>	99
3.3.6.1.3	<i>Proteínas</i>	100
3.3.6.1.4	<i>Lipídios (gorduras)</i>	100
3.3.6.1.5	<i>Carboidratos</i>	101
3.3.6.2	<i>Potencial hidrogeniônico (pH)</i>	101
3.3.6.3	<i>Nitrogênio das bases voláteis totais (N-BVT)</i>	101
3.3.6.4	<i>Nitrogênio da trimetilamina (N-TMA)</i>	102
3.3.6.5	<i>Oxidação lipídica (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS)</i>	103
3.3.6.6	<i>Análises microbiológicas</i>	103
3.3.6.6.1	<i>Contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis</i>	103
3.3.6.6.2	<i>Vibrio spp</i>	104
3.3.6.6.3	<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	105
3.3.6.6.4	<i>Coliformes termotolerantes</i>	106
3.3.7	<i>Análise estatística</i>	108
3.4	<i>Resultados e discussão</i>	109
3.4.1	<i>Taxa de absorção de revestimentos e glaciamento em amostras de camarão congelado</i>	109
3.4.2	<i>Perda de peso em amostras de camarão congelado</i>	110
3.4.3	<i>Perda de revestimentos e glaciamento em amostras de camarão congelado</i>	112
3.4.4	<i>Análises químicas, físico-químicas e microbiológicas</i>	114
3.4.4.1	<i>Composição química das amostras de camarão congelado</i>	114
3.4.4.2	<i>Potencial hidrogeniônico (pH) das amostras de camarão congelado</i>	116
3.4.4.3	<i>Bases voláteis totais (N-BVT) e trimetilamina (N-TMA) das amostras de camarão congelado</i>	119

3.4.4.4	<i>Oxidação lipídica das amostras de camarão congelado</i>	123
3.4.4.5	<i>Análises microbiológicas (contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis, <i>Vibrio spp.</i>, <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> e coliformes termotolerantes) das amostras de camarão congelado</i>	127
3.4.4.5.1	Contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis das amostras de camarão congelado.....	127
3.4.4.5.2	Análises de <i>Vibrio spp.</i> , <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> e coliformes termotolerantes) das amostras de camarão congelado.....	132
3.5	Conclusões	137
	REFERÊNCIAS	138
	APÊNDICE A - ASPECTO DOS 39 REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS DE QUITOSANA E ÓLEOS ESSENCIAIS	162
	APÊNDICE B - ASPECTO DOS FILMES COMESTÍVEIS DE QUITOSANA DE 1%(a), 1,5% (b) e 2%(c)	163
	APÊNDICE C - VALOR UNITÁRIO DO MATERIAL UTILIZADO PARA A PRODUÇÃO DE FILMES E REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS	164
	APÊNDICE D – CUSTOS DE PRODUÇÃO DOS REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS DE 1% DE QUITOSANA E ÓLEOS ESSENCIAIS (POR LITRO)	165
	APÊNDICE E – CUSTOS DE PRODUÇÃO DOS REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS DE 1,5% DE QUITOSANA E ÓLEOS ESSENCIAIS (POR LITRO)	166
	APÊNDICE F – CUSTOS DE PRODUÇÃO DOS REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS DE 2% DE QUITOSANA E ÓLEOS ESSENCIAIS (POR LITRO)	167
	APÊNDICE G - VALORES DE pH, TBARS, BVT E TMA (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO) DAS AMOSTRAS DE CAMARÃO CONGELADO SUBMETIDAS A DIFERENTES TRATAMENTOS DURANTE 180 DIAS DE ESTOCAGEM	168

1 REVISÃO DE LITERATURA

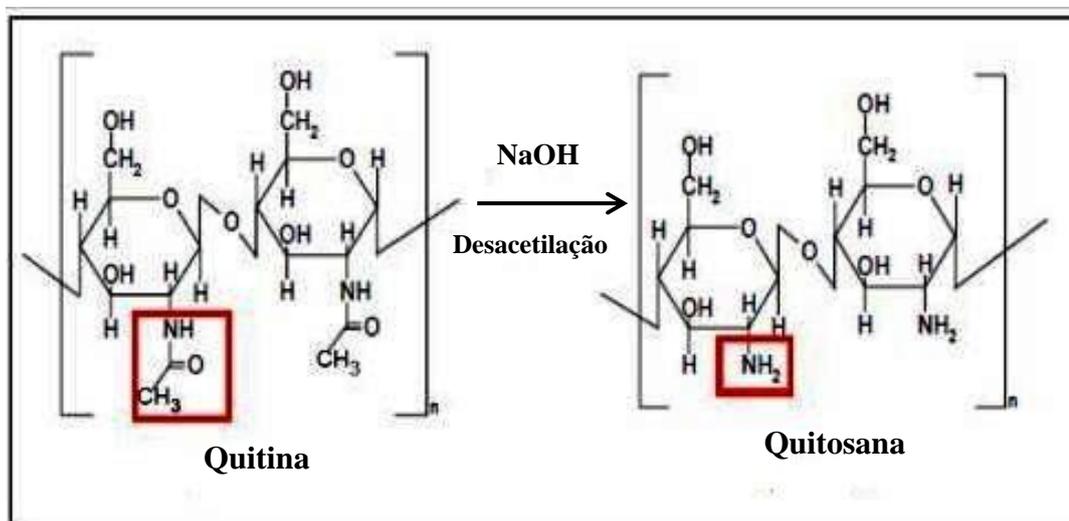
1.1 Aspectos da quitina e da quitosana

A quitina foi descoberta pelo pesquisador francês Henri Braconnot, em 1811, enquanto trabalhava com fungos, denominando-a de fungina (MUZZARELLI *et al.*, 2012). Sendo nomeada como quitina por Odier em 1823, quando isolada a partir de exoesqueleto de insetos (HAMED; OZOGUL; REGENSTEIN, 2016). Pode ser encontrada no exoesqueleto dos artrópodes e insetos, na cutícula dos anelídeos e moluscos, nas paredes celulares de fungos e leveduras e na carapaça de crustáceos como camarão, lagosta e caranguejo (KURITA, 2006). Merece papel de destaque por ser o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, depois da celulose (SILVA *et al.*, 2012; DEHGHANI; HOSSEINI; REGENSTEIN, 2018). Apesar de a quitina ser abundante e ter excelentes características funcionais, como biocompatibilidade, bioatividade, capacidade de biodegradabilidade e alta resistência mecânica, tem uma utilidade limitada devido à sua fraca solubilidade (BEDIAN *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2013). Sua baixa solubilidade é decorrente de sua elevada cristalinidade, a qual é caracterizada pela grande quantidade de ligações de hidrogênio entre suas cadeias (RINAUDO *et al.*, 2006; MOL, 2014).

No entanto a quitosana foi descrita pela primeira vez em 1859 por Rouget e seu nome foi proposto em 1894 por Hoppe-Seyler pelo fato desta substância possuir quantidade de nitrogênio igual à quitina original (ROBERTS, 1992). Sua estrutura química é caracterizada como um polissacarídeo linear formado por β -(1-4)-D-glicosamina, o composto é a forma parcialmente desacetilada da quitina β -(1-4)-N-acetil-D-glicosamina (FIGURA 1). A distinção entre quitina e quitosana é baseada no grau de desacetilação. Quando o processo de desacetilação atinge o patamar de 60%, a quitina é transformada em quitosana, tornando-se solúvel em solução aquosa ácida (CROISIER; JÉRÔME, 2013; BALAN; VERESTIUC, 2014). Quanto maior o grau de desacetilação da quitosana, maior será a interação entre sua superfície e células, uma vez que o grupo amino livre interage com as células causando adesão celular e proliferação (DASH *et al.*, 2011). Além de apresentar uma alta hidrofiliabilidade, devido ao grande número de grupos hidroxila e grupos amino presentes na cadeia polimérica (ASSIS; SILVA, 2003). Tem a capacidade de formar soluções viscosas em vários ácidos orgânicos diluídos como os ácidos acético, fórmico, láctico, entre outros (PARK; MARSH; RHIM, 2002). A solubilidade da quitosana proporciona oportunidades de diversas aplicações, como a produção de filmes, nanofibras, hidrogéis ou pastas, embora alguns usos

em sua forma em pó não dissolvido também tenham sido estudados ultimamente (AHMED *et al.*, 2016; ARDILA *et al.*, 2017).

Figura 1 – Estrutura química da quitina e da quitosana.



Fonte: Stamford (2006)

As diversas atividades biológicas da quitosana incluem capacidade antioxidante, anti-hipertensiva, anticoagulante, antidiabética, antiobesidade, antialérgica, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticancerígena, neuroprotetora e efeitos inibitórios das metaloproteinases da matriz (NGO *et al.*, 2015). Tem papel de destaque devido a suas inúmeras aplicações (QUADRO 1), que são de extrema importância no desenvolvimento de biomateriais (YASSUE-CORDEIRO *et al.*, 2015). Entre as suas propriedades funcionais podemos destacar a atividade antibacteriana, não toxicidade, facilidade de modificação e biodegradabilidade (MUXIKA *et al.*, 2017). Este polímero ainda pode ser utilizado em outras diversas aplicações, tais como: no tratamento de água, agindo na remoção de íons metálicos através da quelação; na medicina e biomedicina, na produção de membranas para diálise, na produção de curativos, na liberação controlada de fármacos, na engenharia de tecidos; cosméticos, em cremes de limpeza e compostos de tratamento de pele e cabelo; na agricultura, com o tratamento de sementes para inibição de fungos; no processamento de alimentos, etc (KUMAR, 2000; MUXIKA *et al.*, 2017). Além de atrair a atenção como potencial conservante alimentar de origem natural (YUAN; CHEN; LI, 2016).

Vale salientar que a quitosana é um conservante alimentar de origem natural que é considerada pela agência *Food Drug Administration* (FDA) como um aditivo seguro, ou seja,

Generally regarded as safe (GRAS) que é a denominação considerada segura para qualquer substância ou produto químico aplicado em alimentos (SAGOO; BOARD; ROLLER, 2002).

Quadro 1 – Principais aplicações da quitosana

ÁREA	APLICAÇÃO
Indústria de Alimentos	Aditivos alimentares Nutrição animal Embalagem biodegradável para alimentos
Farmacéutica	Agente cicatrizante Aditivo de medicamentos Controle de colesterol Lentes de contato
Cosmética	Bactericida Fungicida Umectante
Biomédica	Biomembranas artificiais Sutura cirúrgica
Biotecnologia	Imobilização de enzimas de células Separação de proteínas Cromatografia Agente antimicrobiano
Tratamento de efluentes	Remoção de poluentes

Fonte: Kumar (2000); Yassue-Cordeiro *et al.* (2015); Muxika *et al.* (2017).

A utilização de quitosana na produção de filmes e revestimentos comestíveis tem apresentado importante papel na preservação de alimentos (ELSABEE; ABDU, 2013; KERCH, 2015). Filmes a base de quitosana apresentam geralmente discreta propriedade de barreira ao oxigênio, satisfatória propriedade de barreira ao dióxido de carbono, mas elevada permeabilidade ao vapor de água, devido ao seu caráter hidrofílico (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

1.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são representados por compostos voláteis de baixo peso molecular, responsáveis por um amplo espectro de atividades antimicrobianas e outras propriedades medicinais (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Sendo representados por líquidos aromáticos e voláteis extraídos de componentes das plantas como raízes, flores, caules, folhas, sementes, frutos e da planta inteira (BURT, 2004). Seus principais componentes são hidrocarbonetos, como os terpenos, álcoois, ésteres, aldeídos e compostos fenólicos, que são responsáveis pelo seu aroma característico (BAKKALI *et al.*, 2008).

Em geral os óleos essenciais são classificados como GRAS, ou seja, são considerados seguros, pelo FDA, tornando-os atrativos ao consumidor por não apresentarem efeito tóxico (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009). Representando assim uma alternativa interessante aos ingredientes tradicionais, diversas pesquisas com óleos essenciais vêm sendo desenvolvidas com o intuito de reduzir o uso de aditivos sintéticos na indústria de alimentos (GÓMEZ-ESTACA *et al.*, 2010; DU *et al.*, 2011).

O cravo-da-índia é uma especiaria bastante utilizada desde a antiguidade, devido ao seu sabor e qualidades culinárias, mas também em virtude de suas propriedades medicinais (AFFONSO *et al.*, 2012). O óleo essencial de cravo pode ser caracterizado como fonte de compostos fenólicos tais como o eugenol, acetato de eugenol, ácido gálico, flavonoides, ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos e hidroxifenil propano (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014). Apresenta propriedades que podem favorecer a sua utilização na indústria de alimentos devido ao seu poder de inibir ou retardar o crescimento de bactérias, fungos e leveduras (NAZZARO *et al.*, 2013).

A hortelã pimenta (*Mentha piperita*) é uma das mais populares matérias primas de óleos essenciais, com diversas aplicações nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica. O óleo essencial de hortelã pimenta contém mentol e mentona juntamente com outros componentes químicos menores, incluindo pulegona, mentofurano e limoneno (MCKAY; BLUMBERG, 2006).

Os óleos essenciais cítricos podem ser extensamente utilizados em inúmeras aplicações relacionadas ao sabor, como nas indústrias alimentícia, química, farmacêutica e cosmética (ALPARSLAN *et al.*, 2016). Tendo como característica predominante a riqueza em compostos voláteis, em predominância o limoneno (MOUFIDA; MARZOUK, 2003). O óleo essencial de casca de limão contém principalmente limoneno, com a presença de g-terpineno, b-pineno, myrceno, neral e geranial (VEKIARI *et al.*, 2002). Além de exibir propriedades antimicrobianas e antifúngicas (SETTANNI *et al.*, 2012; COMBRINCK; REGNIER; KAMATOU, 2011). Também em destaque o óleo essencial extraído da casca de tangerina (importante fonte de óleo essencial) que pode ser amplamente utilizado como material para conservar o frescor do pescado durante estocagem (HE; XIAO, 2016). Principalmente devido a casca de tangerina conter muitos flavonóides, especialmente glicosídeos de flavanona e polimetoxi flavonas, que possuem atividade antioxidante,

antimicrobiana, anticancerígena, anti-aterogênica e anti-inflamatória (TRIPOLI *et al.*, 2007; BENAVENTE-GARCIA; CASTILLO, 2008).

As folhas de louro são amplamente utilizadas como tempero, anti-séptico e inseticida (AKCAN *et al.*, 2017). Muitas pesquisas demonstraram que os extratos de folhas de louro têm uma considerável atividade antioxidante (EL; KARAGOZLU; KARAKAYA; SAHIN, 2014). No óleo essencial extraído da folha de louro o principal componente é o 1,8-cineol, podendo conter ainda linalol, α -terpenil acetato, metil-eugenol, sabineno, cineol, pinenos, 4-terpineol e *p*-cimeno (MERGHNI *et al.*, 2016; CHERRAT *et al.*, 2014; CUNHA *et al.*, 2012). Além de apresentar um grande potencial devido as suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (CHERRAT *et al.*, 2014).

O manjeriço (*Ocimum basilicum*) possui propriedades que abrange tanto os óleos essenciais (componentes hidrofóbicos) quanto às substâncias hidrofílicas (CARVALHO, 2012). Além de ser popular na culinária, esta planta tem uso medicinal por possuir substâncias com propriedades antimicrobianas, fungicidas e antioxidantes (CAROVIĆ-STANKO *et al.*, 2010; POLITEO *et al.*, 2007). O óleo essencial de manjeriço é composto principalmente por linalol e metil chavicol, mas também pode apresentar 1,8 - cineol, eugenol, cânfora, estragol e metil-eugenol (SIMON *et al.*, 1990; MARTINS *et al.*, 2010). As potenciais utilidades do óleo essencial de manjeriço tem sido amplamente estudadas, principalmente suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (LEE *et al.*, 2005; POLITEO *et al.*, 2007; SARTORATOTTO *et al.*, 2004; SUPPAKUL *et al.*, 2003a; WANNISSORN *et al.*, 2005; CAROVIĆ-STANKO *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, os óleos essenciais (OEs) têm sido amplamente estudados como aditivos em alimentos, assim podem ser incorporados aos filmes e revestimentos de quitosana, principalmente devido a sua potencial atividade biológica (YUAN; CHEN; LI, 2016).

1.3 Filmes e revestimentos comestíveis utilizados como embalagem

A utilização de filmes em alimentos remonta ao século 12 na China, onde as ceras eram utilizadas para revestir frutas cítricas como meio de retardar a perda de água (SÁNCHEZ-ORTEGA *et al.*, 2014; DEHGHANI; HOSSEINI; REGENSTEIN, 2018). Mas o primeiro filme comestível específico para a conservação de alimentos foi produzido no século

15 no Japão, tendo o leite de soja (Yuba) como matéria-prima (SÁNCHEZ-ORTEGA *et al.*, 2014).

Geralmente, os filmes comestíveis são produzidos separadamente e depois aplicados às superfícies dos alimentos, enquanto os revestimentos são formados diretamente sobre as superfícies alimentares (CORDEIRO DE AZEREDO, 2012). Assim qualquer espécie de camada fina de material utilizado para embalar alimentos com a intenção de prolongar a vida útil do produto e que pode ser consumido juntamente com o alimento pode ser considerado filme ou revestimento comestível (DEHGHANI; HOSSEINI; REGENSTEIN, 2018). O mais importante é que os filmes e revestimentos comestíveis podem ser consumidos de maneira segura junto com os produtos embalados (BOURTOOM, 2008).

Os filmes e revestimentos comestíveis podem atuar como uma barreira a influências externas, como vapor de água e oxigênio, e proceder como um veículo de elementos funcionais para melhorar a qualidade e estender a vida útil dos alimentos (SALGADO *et al.*, 2015; SHI; DUMONT, 2014). Aderidos aos alimentos, os mesmos não devem interferir na aparência natural, além de possuir boa aderência a fim de evitar sua fácil remoção no manuseio, assim também, não acarretar alterações ao sabor ou odor original (ASSIS; BRITO; FORATO, 2009).

A composição de filmes e revestimentos comestíveis é constituída de polímeros naturais que podem melhorar a qualidade e segurança dos alimentos, fornecendo barreiras seletivas à transferência de umidade, absorção de oxigênio, e oxidação lipídica (CERQUEIRA *et al.*, 2009) As matrizes de filmes comestíveis são biopolímeros de excelente qualidade alimentar, como proteínas, lipídios e polissacarídeos (CAZON; VELÁZQUEZ; RAMÍREZ ; VAZZÁS, 2017).

Os plastificantes são aditivos que podem ser adicionados a vários polímeros para melhorar a processabilidade e aumentar a flexibilidade, alterando a viscosidade do sistema e aumentando a mobilidade das macromoléculas (RABELLO, 2000). Em filmes comestíveis podem ser utilizados vários tipos de plastificantes, em destaque o polietilenoglicol, o sorbitol e o glicerol, sendo este último o mais utilizado (CHIUMARELLI; HUBINGER, 2014; ASSIS; BRITO, 2014). O glicerol é um dos agentes plastificantes mais utilizados na composição de soluções filmogênicas, devido a sua estabilidade e compatibilidade com as cadeias poliméricas dos filmes (FERNÁNDEZ CERVERA *et al.*, 2004; CHILLO *et al.*, 2008). E os óleos essenciais podem ser incorporados aos filmes e revestimentos comestíveis,

pois constituem uma alternativa segura para substituir conservantes sintéticos e aditivos alimentares por causa de suas propriedades antioxidantes, antifúngicas e antimicrobianas (KUMAR *et al.*, 2010).

1.4 Propriedades dos filmes comestíveis

1.4.1 Solubilidade em água

A solubilidade em água e a difusibilidade na matriz polimérica dos filmes interferem no processo de transferência de vapor de água (MARTELLI *et al.*, 2006; MOORE *et al.*, 2006; MÜLLER; YAMASHITA; LAURINDO 2008; ZHONG; SONG; LI, 2011). A determinação da solubilidade é bastante proveitosa quando os filmes são consumidos junto a alimentos submetidos a aquecimento antes do consumo e também pode ser um fator importante para indicar a biodegradabilidade dos filmes quando utilizados como embalagem (ROTTA *et al.*, 2009).

Uma menor solubilidade é muitas vezes necessária em filmes comestíveis durante a estocagem, em contrapartida uma alta solubilidade pode ser proveitosa durante a preparação de alimentos revestidos com estes filmes comestíveis (LAOHAKUNJIT; NOOMHORN; 2004).

1.4.2 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água é uma propriedade bastante estudada em filmes comestíveis, devido à importância da água nas reações de deterioração dos alimentos (CERQUEIRA *et al.*, 2009). Os valores de permeabilidade ao vapor de água dos filmes comestíveis podem ser utilizados em prognósticos da vida útil de produtos embalados, pois filmes que apresentam boa barreira às trocas de vapor de água podem ser utilizados para prolongar a vida útil dos mesmos (LOREVICE; MOURA; MATTOSO, 2014).

A adição de plastificantes em filmes de polissacarídeos pode levar ao aumento dos valores de permeabilidade ao vapor de água devido à maior afinidade do sistema para atrair água, já que os plastificantes apresentam comportamento hidrofílico (PINHEIRO *et al.*, 2010).

A quitosana tem a capacidade de produzir filmes com boas propriedades de barreira para aplicação em alimentos (ESCAMILLA-GARCIA *et al.*, 2013). Mas já foram sugeridas inúmeras estratégias para incrementar as propriedades de barreira destes filmes, sendo a incorporação de óleos essenciais de plantas uma alternativa relevante para melhorar estas propriedades, principalmente a permeabilidade ao vapor de água (SHEN; KAMDEM, 2015).

1.4.3 Propriedades mecânicas

O comportamento mecânico dos filmes depende do material filmogênico utilizado, da sua coesão estrutural e de sua estrutura molecular (CANEVAROLO JR, 2007). Filmes produzidos a base de biopolímeros como proteínas e polissacarídeos apresentam boas propriedades mecânicas, mas são altamente permeáveis à água, devido à sua natureza hidrofílica (KRISTO; BILIADERIS; ZAMPRAKA, 2007).

A adição de agentes plastificantes em biopolímeros, como a quitosana, tem um considerável efeito sobre as propriedades mecânicas dos filmes, tais como o aumento da sua flexibilidade e resistência (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2005). Comportamento este caracterizado pela estrutura do polímero, a concentração de plastificante, as condições de armazenamento e a incorporação de compostos (PINHEIRO *et al.*, 2010). A incorporação de óleos essenciais em filmes de quitosana pode apresentar efeitos relevantes nas propriedades mecânicas dos filmes (SHEN; KAMDEM, 2015).

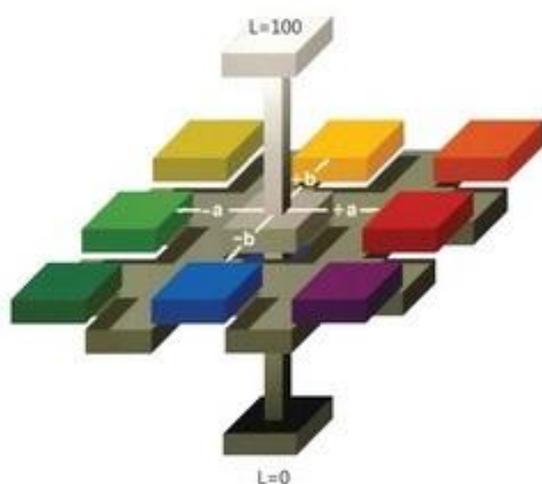
1.4.4 Cor e opacidade

A cor representa uma propriedade de destaque na caracterização dos filmes, pois está relacionada com a matéria-prima utilizada na produção dos mesmos (VICENTINI, 2003). Filmes comestíveis devem ser atrativos do ponto de vista visual e não devem alterar a sua cor ao longo da estocagem, para que a aceitação do produto no qual são aplicados não seja prejudicada (SOUZA *et al.*, 2009).

Os parâmetros relacionados à cor (FIGURA 2) podem ser definidos pelo sistema CIELAB (ou CIE $L^* a^* b^*$), desenvolvido por Richard Hunter e define três coordenadas tridimensionais, L^* representa a luminosidade, que varia entre 0 (preto) e 100 (branco), o a^* e o b^* que representam respectivamente o valor associado ao vermelho/verde e o valor associado ao amarelo/azul (RAMOS; GOMIDE, 2007). A opacidade representa um parâmetro

de primordial relevância em filmes utilizados para embalagens de alimentos (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992; PELISSARI, 2009). Sendo um indicador da quantidade de luz que atravessa o filme e quanto maior o valor de opacidade, menor será a quantidade de luz que atravessa o filme, podendo esta barreira exercer um controle sobre a incidência de luz nos alimentos (PINHEIRO *et al.*, 2010).

Figura 2 - Representação tridimensional de cor Hunter Lab.



Fonte: Hunterlab (1996)

1.5 Aplicação de filmes e revestimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais em pescado

Atualmente inúmeros estudos se concentram na aplicação de filmes e revestimentos comestíveis em uma vasta série de sistemas alimentares para prolongar a vida útil e reduzir os agentes patogênicos dos alimentos (YUAN; CHEN; LI, 2016). A quitosana tem apresentado ação promissora na preservação de alimentos (KERCH, 2015). Na produção de filmes e revestimentos comestíveis, a quitosana apresenta qualidades singulares em razão de ser facilmente obtida, ter amplo potencial como material de embalagem ativa devido à sua atividade antimicrobiana e impermeabilidade ao oxigênio (BUTLER *et al.*, 1996; JEON *et al.*, 2002; NO *et al.*, 2007). Filmes de quitosana possuem propriedades mecânicas precárias (pouca flexibilidade), principalmente devido à sua capacidade inferior de alongamento (VAN DEN BROEK; KNOOP; KAPPEN; BOERIU, 2015). A utilização de um plastificante adequado, em concentração ótima é uma possibilidade simples e bastante utilizada para melhorar as propriedades mecânicas dos filmes de quitosana (PRATEEPCHANACHAI *et al.*,

2017). Óleos essenciais podem ser incorporados a filmes e revestimentos de quitosana por apresentarem propriedades favoráveis que ajudam a melhorar suas características físicas e a prolongar a vida de prateleira dos alimentos revestidos.

Vários estudos demonstraram que os revestimentos de quitosana tem grande potencial para estender a vida útil de pescado (SOUZA *et al.*, 2010a; MOHAN *et al.*, 2012; NOWZARI; SHÁBANPOUR; OJAGH, 2013). Em geral, a aplicação de revestimentos de quitosana incorporados com óleos essenciais auxilia na extensão da vida útil dos produtos revestidos (YUAN; CHEN; LI, 2016). Ojagh *et al.* (2010) observaram que a aplicação de revestimento de quitosana adicionado de óleo essencial de canela permitiu a manutenção da qualidade da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) por maior período de tempo, ampliando assim sua vida de prateleira durante estocagem refrigerada. As amostras de filé de carpa prateada revestidas com quitosana / nanoargila / óleo essencial de alecrim mantidas sob refrigeração apresentaram melhor qualidade, principalmente devido aos menores teores de pH e bases voláteis totais (BVT) e a maior aceitabilidade em comparação aos tratamentos com quitosana pura e controle sem revestimento (ABDOLLAHI *et al.*, 2014). Este comportamento pode ser atribuído ao fato de que os revestimentos de quitosana contendo óleos essenciais podem evitar a oxidação em pescado e inibir o crescimento de micro-organismos deteriorantes (YUAN; CHEN; LI, 2016). Wang *et al.* (2018) constataram que os revestimentos de quitosana e carvacrol tem grande potencial de embalagem ativa para prolongar a vida útil de camarão *Litopenaeus vannamei*.

1.6 Atividade antimicrobiana da quitosana e óleos essenciais

A quitosana é um biopolímero natural com atividade antimicrobiana que pode ser aplicado de diversas formas, tais como produtos farmacêuticos, alimentos, cosméticos e produtos químicos (HOSSEINNEJAD; JAFARI, 2016; MUXIKA *et al.*, 2017). No entanto, a quitosana é dependente de muitos fatores para exibir suas propriedades antimicrobianas, incluindo as condições estruturais tais como peso molecular, grau de desacetilação, forma derivada, concentração, fonte original e principalmente as condições ambientais como o pH, tipo de micro-organismo e certos materiais complexos (HOSSEINNEJAD; JAFARI, 2016)

Segundo Kulikov *et al.* (2014) a quitosana pode ser diferenciada pelo seu peso molecular (PM) como quitosana de alto peso molecular, quitosana de baixo peso molecular e oligoquitosana (quitosana de cadeia curta). Dotada de alto peso molecular não consegue

passar pela membrana microbiana e, portanto, impregna na superfície celular, que bloqueia o transporte de nutrientes para a membrana celular microbiana, resultando em lise celular (LI *et al.*, 2010; TOKURA *et al.*, 1997). Sob outra perspectiva, uma solução dissociada das moléculas de quitosana, com menor peso molecular (<5000 kDa), pode se ligar ao DNA e inibir a síntese do RNAm através da penetração em direção aos núcleos das bactérias (CHIEN *et al.*, 2016; KONG *et al.*, 2008). Ao passo que na quitosana de alto peso molecular as moléculas dissociadas de quitosana podem interagir com a membrana da célula para modificar a permeabilidade celular (BADAWEY; RABEA, 2009; KONG *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2012).

Comercialmente a quitosana é produzida por desacetilação da quitina e no processo de desacetilação, os grupos acetila da cadeia molecular da quitina são retirados para formar grupos amino, sendo o grau de desacetilação que determina o conteúdo de grupos amino livres em polissacarídeos responsáveis pela distinção entre quitina e quitosana (quanto maior o grau de desacetilação maior a solubilidade em soluções ácidas) (HOSSEINNEJAD; JAFARI, 2016). Em geral, a quitosana com maior grau de desacetilação, que tem uma carga positiva mais alta, tende a apresentar uma maior atividade antimicrobiana (TOLAIMATE *et al.*, 2003).

As funções antimicrobianas da quitosana são limitadas porque os grupos amino na estrutura principal da quitosana só conseguem atuar como centros de carga positiva relativamente fracos (HOSSEINNEJAD; JAFARI, 2016). Com o intuito de ampliar a atividade antimicrobiana da quitosana, é plausível aumentar a força das cargas positivas nas moléculas de quitosana ao dotá-las de outros grupos com carga positiva (XIAO *et al.*, 2011). Várias pesquisas vem sendo realizadas para aumentar a solubilidade da quitosana em água e estender as suas aplicações através da produção de derivados funcionais de quitosana, tais como carboximetilquitosana e carboximetilquitosana quaternizada (SUN *et al.*, 2006). A síntese de derivados que contêm grupos antimicrobianos e solúveis em água pode facilitar a utilização da quitosana como material antimicrobiano (LI; YANG; YANG, 2015). Com o intuito de alcançar esta finalidade, dois tipos de grupos funcionais reativos presentes na quitosana (uma amina primária e dois grupos hidroxila) podem ser utilizados para modificar quimicamente suas propriedades e em última instância aumentar o efeito antimicrobiano da quitosana, esse tipo de quitosana é definida como derivada com grupos funcionais antibacterianos duplos (FU *et al.*, 2011).

A quitosana em baixas concentrações se junta à superfície celular carregada negativamente, perturba a membrana celular e provoca a morte da célula, induzindo o vazamento de componentes intracelulares, entretanto em concentrações mais elevadas, a quitosana protonada pode revestir a superfície celular e evitar o vazamento de componentes intracelulares (HOSSEINNEJAD; JAFARI, 2016). E as células bacterianas carregadas positivamente também se repelem e impedem a aglutinação (LIM; HUDSON, 2004).

A fonte de extração da quitosana pode influenciar a sua atividade antimicrobiana (HOSSEINNEJAD; JAFARI, 2016). Chien *et al.* (2016) em pesquisa com quitosana de carapaça de caranguejo e de cogumelo shiitake relataram intensa atividade antimicrobiana de ambas as fontes frente as espécies de bactérias estudadas, mas a quitosana de shiitake foi mais eficiente do que a de carapaça de caranguejo.

A atividade antimicrobiana da quitosana é mais acentuada em pH baixo, em virtude da ionização dos grupos amino da quitosana ocorrer em pH abaixo de 6 (DEVLIEGHERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004). Younes *et al.* (2014), relataram que a redução do pH aumenta a adsorção da quitosana nas células bacterianas, provavelmente devido ao aumento da carga positiva da quitosana. Pois a pH maior que 6, a quitosana tende a perder sua carga e pode precipitar-se da solução por desprotonação dos grupos amino (HOLAPPA *et al.*, 2006; GUZEY; MCCLEMENTS, 2006).

Em termos gerais a quitosana pode apresentar efeitos antimicrobianos mais fortes nas bactérias Gram positivas do que nas bactérias Gram negativas (HOSSEINNEJAD; JAFARI, 2016). A hipótese de uma interação eletrostática entre a quitosana e a parede celular, afirma que os micro-organismos Gram positivos podem ser mais suscetíveis do que os Gram negativos, pois sua parede é composta por uma camada grossa de peptidoglicano e por polímeros chamados ácidos teicoicos que são altamente carregados por grupos fosfato com uma carga negativa, que poderiam estabelecer interações eletrostáticas com compostos antimicrobianos catiônicos, como a quitosana (FERNANDEZ-SAIZ; LAGARON; OCIO, 2009). Younes *et al.* (2014) observaram que a atividade antibacteriana da quitosana pode ser melhorada para bactérias Gram negativas com o decréscimo do peso molecular da quitosana, enquanto ocorre o efeito oposto com bactérias Gram positivas.

Vários mecanismos foram sugeridos para esclarecer a atividade antimicrobiana de óleos essenciais, incluindo a separação da camada lipídica na membrana celular, perturbando assim os sistemas enzimáticos, comprometendo o material genético das bactérias

e formando hidroperoxidase dos ácidos graxos causada pela oxigenação de ácidos graxos insaturados (ATARÉS; CHIRALT, 2016; BURT *et al.*, 2007; DI PASQUA *et al.*, 2006).

Em óleo essencial de cravo, a ação antimicrobiana pode ser atribuída ao eugenol, pois o mesmo representa mais de 80% da composição deste óleo. O eugenol pode ser caracterizado como uma substância de reconhecida atividade antibacteriana e anti-inflamatória (AFFONSO *et al.*, 2012). No óleo essencial do manjeriço a atividade antimicrobiana tem sido principalmente associada aos seus constituintes majoritários, o metil chavicol e o linalol (MARTINS *et al.*, 2010). Os óleos essenciais cítricos demonstram em diversos estudos satisfatória atividade antimicrobiana. Em destaque o óleo essencial de casca de tangerina que inibiu o crescimento bacteriano em amostras de carpa (*Megalobrama amblycephala*) (HE; XIAO, 2012). Guerra *et al.* (2013) demonstraram a ação antimicrobiana de óleo essencial de limão (*Citrus limon*). O óleo essencial de hortelã pode apresentar comportamento inibitório ao crescimento de bactérias Gram positivas e Gram negativas (SINGH; SHUSHNI; BELKHEIR, 2015). E o óleo essencial de louro também apresenta considerável potencial como antimicrobiano natural em alimentos (SILVEIRA, 2012).

A incorporação de óleos essenciais (OEs) em filmes e revestimentos comestíveis à base de polissacarídeos, como a quitosana, representa um potencial promissor devido às suas propriedades bactericidas e fungicidas (ALI; NOH; MUSTAFA, 2015). Óleos essenciais como o cravo, a tangerina e o orégano podem ser adicionados com êxito aos filmes e revestimentos de quitosana devido a acentuada atividade antimicrobiana contra uma vasta gama de micro-organismos (LEKJING, 2016; SEVERINO *et al.*, 2014; SHEKARFOROUSH *et al.*, 2015).

Nos filmes de quitosana incorporados com óleos essenciais, o possível aparecimento de interações entre os componentes dos óleos essenciais e da quitosana pode abalar a eficiência da resposta antimicrobiana dos filmes (YUAN; CHEN; LI, 2016). A quitosana pode interagir com os terpenos (principais componentes dos óleos essenciais), principalmente por interações fracas como as pontes de hidrogênio (MAYACHIEW; DEVAHASTIN; MACKAY; NIRANJAN, 2010). Estas interações entre os óleos e a matriz polimérica da quitosana poderia reduzir a quantidade de óleo liberada, aumentando assim a atividade antimicrobiana e mantendo uma concentração relativamente alta de óleo no sistema (WANG *et al.*, 2011). Em contrapartida, as interações químicas entre grupos funcionais de

quitosana e os óleos essenciais poderia levar a alteração das propriedades físico-químicas dos filmes (YUAN; CHEN; LI, 2016). Consequentemente, o efeito antimicrobiano de filmes de quitosana incorporados com óleos essenciais pode ser alterado (WANG *et al.*, 2011).

Em termos gerais, os filmes de quitosana incorporados com óleos essenciais exibem maior eficiência contra bactérias Gram positivas do que Gram negativas, o que pode ser explicado pela diferença característica da membrana externa entre as bactérias Gram positivas e bactérias Gram negativas, visto que a membrana externa das bactérias Gram negativas restringe a difusão de compostos hidrofóbicos através da sua camada de lipopolissacarídeos (YUAN; CHEN; LI, 2016). Em vários estudos sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais contra micro-organismos deteriorantes e patogênicos Burt (2004) constatou que as bactérias Gram negativas eram mais resistentes aos óleos essenciais.

Ademais da atividade antibacteriana da quitosana e dos óleos essenciais, a interação da quitosana com os óleos essenciais pode aumentar a molhabilidade e as propriedades interfaciais dos revestimentos de quitosana, que são primordiais para ampliar a aderência da matriz do filme ou revestimento a superfície dos alimentos, eventualmente aperfeiçoando a eficiência antimicrobiana do polímero (KUREK; GALUS; DEBEAUFORT, 2014).

1.7 Qualidade e frescor do pescado

A qualidade dos alimentos está relacionada a inúmeros aspectos, podendo ser avaliada pela higiene, valor nutricional e dietético, frescor, facilidade de utilização pelo consumidor, suas propriedades intrínsecas e disponibilidade (NUNES; BATISTA; CARDOSO, 2007). O pescado pode ser caracterizado como um produto altamente perecível, tendo uma vida útil curta, devido a diversas reações químicas e a deterioração microbiana (DEHGHANI; HOSSEINI; REGENSTEIN, 2018). Sendo a carne do pescado favorável à deterioração, em consequência do rápido crescimento de micro-organismos e proliferação de patógenos alimentares (SEDIGH-JASOUR; EHSANI; MEHRYAR; NAGHIBI, 2015). Para manter a qualidade do pescado, torna-se primordial a implantação de práticas de higiene e de conservação em toda a cadeia produtiva, desde a captura até a comercialização (SOUZA, *et al.*, 2013).

Inúmeros fatores podem ser responsáveis pela rápida alteração no frescor do pescado, como o local de captura e o tamanho do pescado, a quantidade de lipídeos existente,

o método de captura, a carga bacteriana existente e a temperatura de estocagem (LOSADA *et al.*, 2005). A rancificação é um sério contratempo em pescado rico em ácidos graxos, relacionada principalmente com o armazenamento seco ou congelado e geralmente prejudica a sua vida útil com o aparecimento de sabores desagradáveis (DEHGHANI; HOSSEINI; REGENSTEIN, 2018).

A qualidade do pescado pode ser determinada através de métodos microbiológicos, físico-químicos ou sensoriais (ÖZYURT *et al.*, 2009). Os métodos microbiológicos são responsáveis pela avaliação do crescimento de bactérias deteriorantes, testes físico-químicos estão diretamente ligados a avaliação da formação de compostos de degradação (determinação do pH, amônia e quantificação do nitrogênio das bases voláteis totais) e testes sensoriais utilizam os órgãos do sentido para determinar a qualidade do pescado (GONÇALVES, 2011).

A determinação do pH muscular é um método utilizado para avaliar o frescor com ressalvas, mas, no entanto, é uma metodologia simples e de rápida execução (FONTES *et al.*, 2007). Um dos métodos mais utilizados para a determinação do frescor do pescado é a quantificação do Nitrogênio das Bases Voláteis Totais (N-BVT), pois apresenta uma metodologia analítica simples e um custo ínfimo (MALLE; POUMEYROL, 1989). Em uma amostra de pescado, o valor de N-BVT representa a quantificação de aminas como a Trimetilamina (TMA), dimetilamina (DMA) e amônia, que são formadas durante o processo de deterioração do pescado (HOWGATE, 2010). O frescor do ponto de vista microbiológico é um importante parâmetro de qualidade em pescado, já que o crescimento microbiano é um dos fatores primordiais que conduzem à deterioração deste grupo alimentar (GERMANO; GERMANO, 2008; GONÇALVES, 2011). Ainda assim o grau de frescor pode estar diretamente associado à qualidade do pescado, ou seja, a avaliação das características observadas sensorialmente pelo consumidor no momento da aquisição do produto, como o aspecto geral, o odor e a coloração dos olhos e das brânquias (BORGES *et al.*, 2013).

Vários aspectos relacionados ao pescado podem estar associados a sua perda de qualidade como as condições de higiene no processamento, transporte e armazenamento, o pH próximo à neutralidade, a elevada atividade de água nos tecidos, o alto teor de nutrientes, a ação de enzimas autolíticas presentes nos tecidos e a alta atividade metabólica da microbiota presente (ABREU *et al.*, 2008; SOARES; VALE; JUNQUEIRA, 1998).

1.8 Informações gerais sobre o camarão

1.8.1 Camarão marinho - *Litopenaeus vannamei*

O camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) é nativo da costa do oceano Pacífico e pode ser encontrado desde a Província de Sonora, no México até o Sul de Tumbes, no Peru (BARBIERI JUNIOR; OSTRENSKY NETO, 2002; YUAN; LV; TANG; ZHANG; SUN, 2016). O *Litopenaeus vannamei* (FIGURA 3) conhecido popularmente como camarão branco do pacífico ou camarão cinza apresenta fácil adaptabilidade às condições de cultivo, além de alta taxa de crescimento e tolerância a ampla faixa de salinidade (COSTA, 2004). Tendo papel de destaque entre as espécies mais cultivadas no mundo devido à sua típica coloração e ampla aceitação nos mercados internacionais (SANTOS *et al.*, 2009).

Figura 3 – Camarão marinho *Litopenaeus vannamei*



Fonte: Própria do autor (2018)

No Brasil é a espécie de camarão mais cultivada, sendo introduzido no país no início da década de 1980, proveniente do México, El Salvador, Panamá, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela (MOLES; BUNGE, 2002). A partir da década de 1990, os laboratórios brasileiros conseguiram dominar as tecnologias relacionadas à reprodução e produção de pós-larvas dessa espécie, iniciando a distribuição comercial e intensificando as validações tecnológicas nas fazendas de cultivo (LIMA, 2007). Impulsionados pelo modelo bem sucedido da larvicultura, os avanços tecnológicos relacionados ao cultivo de camarões, como o uso de aeradores e máquinas de despesca, o manejo no fundo do tanque e a utilização de comedouros fixos na alimentação, e o sistema de beneficiamento como o processamento e o controle de qualidade, viabilizaram o desenvolvimento da carcinicultura como um todo (CAVALCANTI, 2003).

Em virtude do total conhecimento da tecnologia de produção da espécie *L. vannamei*, a carcinicultura brasileira sofreu um rápido desenvolvimento, principalmente na Região Nordeste que chegou a ser responsável por 95,2% da produção nacional (ROCHA; RODRIGUES; AMORIM, 2004). Esta espécie tem este grande potencial devido à boa adaptação às condições climáticas brasileiras, rusticidade, crescimento favorável e tolerância à salinidade (CASTRO; PAGANI, 2004).

1.8.2 Camarão como alimento

O camarão se destaca mundialmente como importante alimento, devido ao seu considerável valor nutricional e econômico (YUAN; LV; TANG; ZHANG; SUN, 2016). Sendo um produto de alto valor comercial e bastante apreciado pelos consumidores por apresentar características sensoriais tais como: textura, sabor e aroma favoráveis (BORN, 2012). Mas apesar de apresentar sabor e textura singulares pode ter uma vida útil limitada devido a alterações bioquímicas, microbiológicas ou físicas durante a estocagem (ALOTAIBI; TAHERGORABI, 2018). Como produto pesqueiro tem sido alvo de inúmeras pesquisas científicas devido a vida útil curta, em razão da elevada atividade de água, composição química, gordura insaturada e pH neutro (GONÇALVES, 2011). Na sua carne também contém grande quantidade de aminoácidos livres que podem contribuir para a sua deterioração (YASSORALIPOUR *et al.*, 2013).

Técnicas convencionais de preservação, tais como armazenamento frio, congelamento e refrigeração podem ser utilizadas para manter a qualidade e prolongar a vida de prateleira do camarão (WANG *et al.*, 2018). Contudo, estas técnicas convencionais podem não anular eficientemente a deterioração (ARANCIBIA *et al.*, 2015). Assim os filmes e revestimentos comestíveis podem ser utilizados como uma excelente alternativa para aumentar a vida de prateleira do camarão (ARANCIBIA *et al.*, 2014b; FARAJZADEH *et al.*, 2016).

2 FILMES E REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS DE QUITOSANA E ÓLEOS ESSENCIAIS

RESUMO

Os avanços na área alimentícia levaram ao desenvolvimento de filmes e revestimentos comestíveis a base de polímeros naturais como a quitosana, devido à sua atividade antimicrobiana, maior resistência à água e menor permeabilidade aos vapores de água. Nesse contexto, a ação antimicrobiana dos óleos essenciais também tem sido amplamente estudada e têm potencial promissor. O presente estudo teve por objetivo avaliar as propriedades físicas e mecânicas dos filmes com diferentes concentrações de quitosana e óleos essenciais (cravo, hortelã, limão, louro, manjeriço e tangerina), além de avaliar a atividade antimicrobiana dos revestimentos dos mesmos componentes dos filmes. Os filmes e revestimentos de quitosana (1%, 1,5% e 2%) e óleos essenciais (0,5 e 1%) foram divididos em 39 tratamentos. Foram avaliadas as propriedades dos filmes como a solubilidade, permeabilidade ao vapor de água (PVA), cor, opacidade, resistência à tração, alongação na ruptura e módulo de elasticidade em todos os tratamentos. A atividade antimicrobiana dos revestimentos foi testada quanto a cepas padrões de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* ATCC 13076 e *Vibrio parahaemolyticus* IOC 18950. A solubilidade dos filmes registrou variação de 16,14 a 33,59% e apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) de acordo com a concentração de quitosana e óleo essencial. Na PVA ocorreu uma variação de 0,93 a 2,02 g/m.dia.atm, a espessura dos filmes variou de 0,060 a 0,147 mm, em ambos os testes a diferença apresentada foi significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Foram também significativas as diferenças de cor, opacidade, resistência à tração, alongação na ruptura e módulo de elasticidade de acordo com a concentração de quitosana e óleo essencial. Todos os revestimentos apresentaram a formação de halo de inibição, evidenciando sua atividade antimicrobiana frente às cepas padrões utilizadas e apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Filmes e revestimentos à base de quitosana e óleos essenciais podem ser utilizados para prolongar a vida útil e manter a qualidade de alimentos devido a suas excelentes propriedades e atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Biopolímero. Compostos voláteis. Propriedades físicas e mecânicas, Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Advances in the food area led to the development of edible films and coatings materials based on natural polymers such as chitosan, due to their antimicrobial activity, resistance to water and less permeability to water vapors. In this context, the antimicrobial action of essential oils has also been widely studied and presents a promising potential. The aim of the present study was to evaluate the physical and mechanical properties of films with different concentrations of chitosan and essential oils (clove, Peppermint, lemon, laurel, basil, and tangerine), as well as to evaluate the antimicrobial activity of coatings of the films components. The films and coatings of chitosan (1%, 1.5% and 2%) and essential oils (0.5 and 1%) were divided into 39 treatments. The properties of films such as solubility, water vapor permeability (WVP), color, opacity, tensile strength, elongation at break and elastic modulus in all treatments were evaluated. The antimicrobial activity of the coatings was tested for standard strains of *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* ATCC 13076 and *Vibrio parahaemolyticus* IOC 18950. The solubility of the films varied of 16.14 to 33.59% and presented significant differences ($p < 0.05$) according to the concentration of chitosan and essential oil. In WVP, there was a variation from 0.93 to 2.02 g/m.day.atm, the thickness of the films ranged from 0.060 to 0.147 mm, in both tests was observed difference significant ($p < 0.05$) between the treatments. Differences in color, opacity, tensile strength, elongation at break and elastic modulus were also significant according to the concentration of chitosan and essential oil. All coatings presented inhibition halo formation, evidencing their antimicrobial activity against the standard strains and presented significant differences ($p < 0.05$) between the treatments. Films and coatings based on chitosan and essential oils can be used to extend shelf life and maintain food quality due to their excellent properties and antimicrobial activity.

Keywords: Biopolymer. Volatile compounds. Physical and mechanical properties. Antimicrobial activity.

2.1 Introdução

A demanda cada vez maior dos consumidores por alimentos com alto nível de qualidade, além da preocupação com o meio ambiente quanto ao aumento do efeito adverso das embalagens sintéticas, tem orientado a indústria de alimentos ao desenvolvimento de filmes e revestimentos comestíveis (BEVERLYA *et al.*, 2008). Revestimentos comestíveis são aplicados em forma líquida enquanto os filmes comestíveis são películas sólidas utilizadas para embrulhar produtos alimentares (FALGUERA *et al.*, 2011). Os filmes e revestimentos comestíveis desempenham uma excelente vantagem em relação às embalagens sintéticas, pois auxiliam no tempo de conservação dos alimentos devido a suas propriedades de barreira e por introduzir compostos funcionais importantes na alimentação (SRINIVASA; RAMESH; THARANATHAN, 2007). Assim os filmes e revestimentos são as formas mais vantajosas para manter a qualidade e segurança de vários tipos de produtos alimentares (DEHGHANI; HOSSEINI; REGENSTEIN, 2018).

A utilização de filmes comestíveis de polímeros naturais e biodegradáveis tem sido uma importante alternativa a substituição de embalagens plásticas devido à sua excelente biodegradabilidade, biocompatibilidade e a sua gama de potenciais aplicações (SHOJAEI-ALIABADI *et al.*, 2014). Na produção de filmes e revestimentos podemos destacar três tipos de materiais utilizados: polissacarídeos, tais como amido, celulose, alginato, carragenana, quitosana e pectina; proteínas, como caseína, proteína de soja, zeína, glúten, queratina e albumina; e lipídios, como cera de candelilla, cera de abelha, cera de carnaúba e óleo mineral (SOUZA *et al.*, 2010b).

Um dos principais compostos que constituem os resíduos de camarões, caranguejos e siris é a quitina, correspondendo 15 a 20% do peso da carapaça. Devido a sua versatilidade a quitina pode ser utilizada em aplicações na área médica, farmacêutica e na indústria alimentícia, mas seu principal destino é a produção de quitosana que é um polímero natural derivado da desacetilação de quitina.

A quitosana é um material para a produção de filmes comestíveis que merece atenção pelo grande potencial de formar filmes, ampla atividade antimicrobiana e compatibilidade com outras substâncias (SABAGHI *et al.*, 2015). Filmes e revestimentos à base de quitosana podem ser utilizados com segurança para prolongar a vida útil e manter a qualidade de diversos alimentos devido à sua natureza não tóxica e biodegradável e à sua disponibilidade comercial (THARANATHAN; KITTUR, 2003). Os filmes de quitosana

apresentam coloração clara, força e flexibilidade, que proporcionam excelentes barreiras ao oxigênio, bem como ampla ação antimicrobiana (ESCAMILA-GARCIA *et al.*, 2013).

Os óleos essenciais são compostos voláteis, naturais e complexos, possuem um forte odor e são constituídos a partir de plantas aromáticas como metabólitos secundários, possuindo propriedades medicinais (BAKKALI *et al.*, 2008). Pois além de apresentarem atividade antioxidante e anti-inflamatória são considerados como os agentes antimicrobianos mais importantes presentes nas plantas (BAJPAI *et al.*, 2008). A incorporação de óleos essenciais de plantas representam uma possibilidade relevante de lipídios que podem ser adicionados aos filmes e revestimentos comestíveis (SHEN; KAMDEM, 2015). Compostos voláteis como os óleos essenciais podem ser incorporados aos filmes para incrementar suas propriedades funcionais, como a permeabilidade ao vapor de água, bem como as propriedades antimicrobianas e antioxidantes (GARCÍA; MARTINO; ZARITZKY, 2000; SEDYIM; SARIKUS, 2006).

As principais propriedades funcionais dos filmes utilizados para embalagens de alimentos são as propriedades ópticas, mecânicas e de barreira (FERNANDES, 2014). Quanto ao aspecto visual, os filmes devem exibir opacidade e coloração atrativas, e não apresentar alterações na cor ao longo do tempo de estocagem para não afetar a aceitação do produto embalado (FERREIRA, 2006). A resistência à ruptura e a abrasão são importantes propriedades, pois os filmes devem ser resistentes para reforçar a estrutura do produto, facilitar o seu manejo e se adaptar às possíveis deformações sem se romper (SARANTÓPOULOS *et al.*, 2002). Nos últimos anos, diferentes trabalhos estudaram o uso de ácidos graxos como componentes lipídicos para serem incorporados aos filmes de quitosana para melhorar a barreira ao vapor de água (RUIZ-NAVAJAS *et al.*, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2014).

Filmes e revestimentos de quitosana têm sido amplamente utilizados devido à sua capacidade de inibir o crescimento de diversas bactérias e patógenos fúngicos (ROMANAZZI *et al.*, 2002). A adição de óleos essenciais em filmes e revestimentos comestíveis de quitosana pode ser uma alternativa vantajosa para incrementar as propriedades antimicrobianas da quitosana, ao mesmo tempo em que a matriz higroscópica pode ter seu caráter reduzido (PERDONES *et al.*, 2016).

O presente estudo tem por objetivo avaliar as propriedades físicas e mecânicas dos filmes com diferentes concentrações de quitosana e óleos essenciais (cravo, hortelã, limão,

louro, manjeriço e tangerina) tais como solubilidade, permeabilidade ao vapor de água, cor, opacidade, resistência à tração, alongação na ruptura e módulo de elasticidade, além de avaliar a atividade antimicrobiana dos revestimentos de seus componentes isolados.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

Avaliar as propriedades físicas e mecânicas dos filmes com diferentes concentrações de quitosana e óleos essenciais (cravo, hortelã, limão, louro, manjerição e tangerina) e a atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis dos mesmos componentes dos filmes.

2.2.2 Objetivos específicos

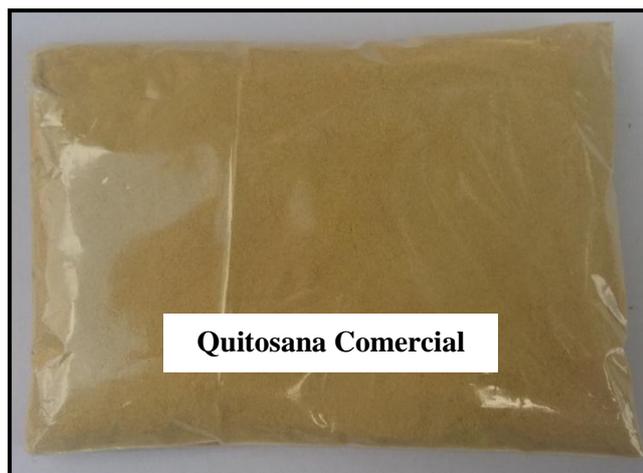
- Elaborar filmes e revestimentos comestíveis à base de quitosana e óleos essenciais;
- Avaliar as propriedades físicas (solubilidade, permeabilidade ao vapor de água, cor e opacidade) e mecânicas (resistência à tração, alongação na ruptura e módulo de elasticidade) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais;
- Investigar a ação antimicrobiana dos revestimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais.

2.3 Material e métodos

2.3.1 Materiais para produção de revestimentos e filmes comestíveis

A quitosana de alto peso molecular utilizada no experimento (FIGURA 4), com grau de desacetilação de 95,1%, foi obtida na empresa Polymar Indústria e Comércio Ltda.

Figura 4 – Quitosana em pó utilizada nos filmes e revestimentos comestíveis.



Fonte: Própria do autor (2018).

Foram testados 12 óleos essenciais quanto a sua incorporação nos revestimentos e filmes de quitosana. Os óleos essenciais testados foram andiroba, pequi, gengibre, noz moscada, canela, palmarosa, cravo, hortelã, limão, louro, manjeriço e tangerina, mas os seis primeiros óleos não obtiveram uma boa homogeneização com a solução filmogênica de quitosana (revestimento), pois após a secagem dos filmes foi visível a presença de gotas de óleo na superfície dos filmes. Assim os óleos de cravo, hortelã, limão, louro, manjeriço e tangerina foram escolhidos devido à sua satisfatória homogeneização/incorporação do óleo ao revestimento e ou filme de quitosana, não apresentando gotas de óleo na superfície dos filmes após a sua secagem.

Os óleos essenciais essenciais (FIGURA 5) de cravo (*Eugenia caryophyllus*), hortelã (*Mentha piperita*), limão (*Citrus limonum*), manjeriço (*Ocimum basilicum*) e tangerina (*Citrus nobilis*) foram adquiridos na empresa Bioessência e o óleo essencial de louro (*Laurus nobilis*) na empresa Terra flor. E também foram utilizados ácido láctico e glicerol da marca Dinâmica.

Figura 5 – Óleos essenciais utilizados nos filmes e revestimentos comestíveis.



Fonte: Própria do autor (2018).

2.3.2 Preparação dos revestimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais

As soluções filmogênicas (revestimentos) foram produzidas no Laboratório de Tecnologia do Pescado (LATEPE), da Universidade Federal do Ceará. A metodologia utilizada está de acordo com SOUZA *et al.*, (2010a), com adaptações. Todos os revestimentos produzidos nas concentrações de quitosana 1%, 1,5% e 2 % (p/v) foram solubilizados em solução de ácido láctico a 1% (v/v) sob agitação com auxílio de agitador magnético (FISATOM Modelo 753) durante 3 horas, em temperatura ambiente e o glicerol 0,5% (v/v) foi utilizado como plastificante. Após a solubilização dos revestimentos de quitosana foi incorporado separadamente cada óleo essencial (cravo, hortelã, limão, louro manjericão e tangerina) nas concentrações de 0,5% e 1% (v/v) também sob agitação por 30 minutos. Para cada revestimento foi mensurado o valor de pH com o auxílio de potenciômetro digital (KASVI Modelo K39-2014B). A análise foi realizada em duplicata pela medição direta da solução filmogênica (revestimento).

2.3.3 Preparação dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais

Todos os revestimentos foram utilizados para a preparação dos filmes de quitosana 1%, 1,5% e 2% e óleos essenciais (0,5% e 1%). Sendo produzidos através da técnica de *casting* (evaporação do solvente), conforme SOUZA *et al.*, (2010a), com adaptações, onde 28 mL de cada revestimento preparado foi dispensado sobre a superfície de placas de Petri de 9 cm de diâmetro e a secagem foi realizada em estufa de recirculação (Marca Nova Ética) em temperatura controlada de 35 °C por 36 h. Após secagem as amostras

foram acondicionadas em dessecador contendo sílica gel, com umidade relativa e temperatura constantes, respectivamente 10% e 25° C.

2.3.4 Descrição dos revestimentos e filmes comestíveis

De acordo com a descrição (QUADRO 2) foram elaborados 3 revestimentos de quitosana (soluções mães de 1%, 1,5% e 2%) e 36 revestimentos de quitosana com óleos essenciais de cravo, hortelã, limão, louro, manjerição e tangerina (0,5% e 1%), totalizando 39 tratamentos. Sendo divididos em três grupos (cada grupo com 13 revestimentos de quitosana e óleos essenciais) de acordo com a concentração de quitosana (1%, 1,5% e 2%) e os filmes foram denominados da mesma maneira que os revestimentos.

Quadro 2 – Descrição dos revestimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais produzidos em laboratório

REVESTIMENTOS	
1% Q	Revestimento de 1% de quitosana
1% Q - CR 0,5%	Revestimento de 1% de quitosana com 0,5 % de óleo essencial de cravo
1% Q - CR 1%	Revestimento de 1% de quitosana com 1% de óleo essencial de cravo
1% Q - HO 0,5%	Revestimento de 1% de quitosana com 0,5 % de óleo essencial de hortelã
1% Q - HO 1%	Revestimento de 1% de quitosana com 1% de óleo essencial de hortelã
1% Q - LI 0,5%	Revestimento de 1% de quitosana com 0,5 % de óleo essencial de limão
1% Q - LI 1%	Revestimento de 1% de quitosana com 1% de óleo essencial de limão
1% Q - LO 0,5%	Revestimento de 1% de quitosana com 0,5 % de óleo essencial de louro
1% Q - LO 1%	Revestimento de 1% de quitosana com 1% de óleo essencial de louro
1% Q - MA 0,5%	Revestimento de 1% de quitosana com 0,5 % de óleo essencial de manjeriçao
1% Q - MA 1%	Revestimento de 1% de quitosana com 1% de óleo essencial de manjeriçao
1% Q - TA 0,5%	Revestimento de 1% de quitosana com 0,5 % de óleo essencial de tangerina
1% Q - TA 1%	Revestimento de 1% de quitosana com 1% de óleo essencial de tangerina
1,5% Q	Revestimento de 1,5% de quitosana
1,5% Q - CR 0,5%	Revestimento de 1,5% de quitosana com 0,5 % de óleo essencial de cravo
1,5% Q - CR 1%	Revestimento de 1,5% de quitosana com 1% de óleo essencial de cravo
1,5% Q - HO 0,5%	Revestimento de 1,5% de quitosana com 0,5 % de óleo essencial de hortelã
1,5% Q - HO 1%	Revestimento de 1,5% de quitosana com 1% de óleo essencial de hortelã
1,5% Q - LI 0,5%	Revestimento de 1,5% de quitosana com 0,5 % de óleo essencial de limão
1,5% Q - LI 1%	Revestimento de 1,5% de quitosana com 1% de óleo essencial de limão
1,5% Q - LO 0,5%	Revestimento de 1,5% de quitosana com 0,5 % de óleo essencial de louro
1,5% Q - LO 1%	Revestimento de 1,5% de quitosana com 1% de óleo essencial de louro
1,5% Q - MA 0,5%	Revestimento de 1,5% de quitosana com 0,5 % de óleo essencial de manjeriçao
1,5% Q - MA 1%	Revestimento de 1,5% de quitosana com 1% de óleo essencial de manjeriçao
1,5% Q - TA 0,5%	Revestimento de 1,5% de quitosana com 0,5 % de óleo essencial de tangerina
1,5% Q - TA 1%	Revestimento de 1,5% de quitosana com 1% de óleo essencial de tangerina
2% Q	Revestimento de 2 % de quitosana
2% Q - CR 0,5%	Revestimento de 2 % de quitosana com 0,5 % de óleo essencial de cravo
2% Q - CR 1%	Revestimento de 2 % de quitosana com 1% de óleo essencial de cravo
2% Q - HO 0,5%	Revestimento de 2 % de quitosana com 0,5 % de óleo essencial de hortelã
2% Q - HO 1%	Revestimento de 2 % de quitosana com 1% de óleo essencial de hortelã
2% Q - LI 0,5%	Revestimento de 2 % de quitosana com 0,5 % de óleo essencial de limão
2% Q - LI 1%	Revestimento de 2 % de quitosana com 1% de óleo essencial de limão
2% Q - LO 0,5%	Revestimento de 2 % de quitosana com 0,5 % de óleo essencial de louro
2% Q - LO 1%	Revestimento de 2 % de quitosana com 1% de óleo essencial de louro
2% Q - MA 0,5%	Revestimento de 2 % de quitosana com 0,5 % de óleo essencial de manjeriçao
2% Q - MA 1%	Revestimento de 2 % de quitosana com 1% de óleo essencial de manjeriçao
2% Q - TA 0,5%	Revestimento de 2 % de quitosana com 0,5 % de óleo essencial de tangerina
2% Q - TA 1%	Revestimento de 2 % de quitosana com 1% de óleo essencial de tangerina

Fonte: Própria do autor (2018).

2.3.5 Propriedades dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais

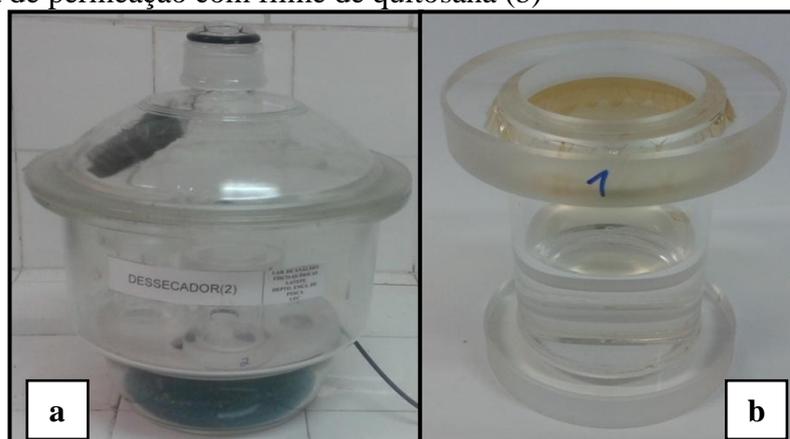
2.3.5.1 Solubilidade em água

A solubilidade pode ser definida como a porcentagem da matéria seca do filme após 24 h de imersão em água destilada (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992). A matéria seca inicial dos filmes foi determinada por secagem de discos com 2 cm de diâmetro em estufa, a 105 °C, durante 24 h. Após este período, os discos foram pesados e imersos em 50 mL de água destilada, com agitação periódica de 82 rpm em mesa agitadora orbital SL 180 (marca SOLAB), por 24 h a 25 °C. Em seguida os filmes foram retirados da imersão e secos em estufa (105 °C por 24 h) para determinar a matéria seca final. A solubilidade foi expressa como a diferença entre a matéria seca inicial e final em relação à matéria seca inicial. Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.3.5.2 Permeabilidade ao vapor de água e espessura

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada por gravimetria baseada no método ASTM E96-92 (GUILLARD *et al.*, 2003; MCHUGH; AVENABUSTILLOS; KROCHTA, 1993). Os filmes testados foram selados no topo de uma célula de permeação contendo 50 mL de água destilada (100% UR; 2337 Pa, pressão de vapor a 20 °C), acondicionados em dessecador a 25 °C e 10% UR com sílica gel. As células foram pesadas em intervalos de 2 horas durante 10 horas (FIGURA 6).

Figura 6 – Dessecador para acondicionamento das células de permeação (a) e célula de permeação com filme de quitosana (b)



Fonte: Própria do autor (2016)

Sendo o valor de permeabilidade determinado pela perda de água no interior da célula para a sílica presente no dessecador. Condições de pressão de água em estado estacionário e uniforme foram assumidas, mantendo a circulação de ar constante fora da célula de teste usando um ventilador em miniatura no interior do dessecador. A inclinação da

curva que representa a perda de peso em função do tempo foi obtida por regressão linear. A PVA dos filmes foi definida de acordo com a equação 1:

$$PVA = \frac{(TTVA \times L)}{\Delta P} \quad (1)$$

Em que TTVA é a taxa de transmissão de vapor de água ($g \times m^{-2} \times n^{-1}$) calculada através do filme (a partir da inclinação da curva dividida pela área do filme), L é a espessura média do filme (m) e ΔP é a diferença de pressão parcial de vapor de água (atm) nos dois lados do filme. Para cada filme foram realizadas três repetições.

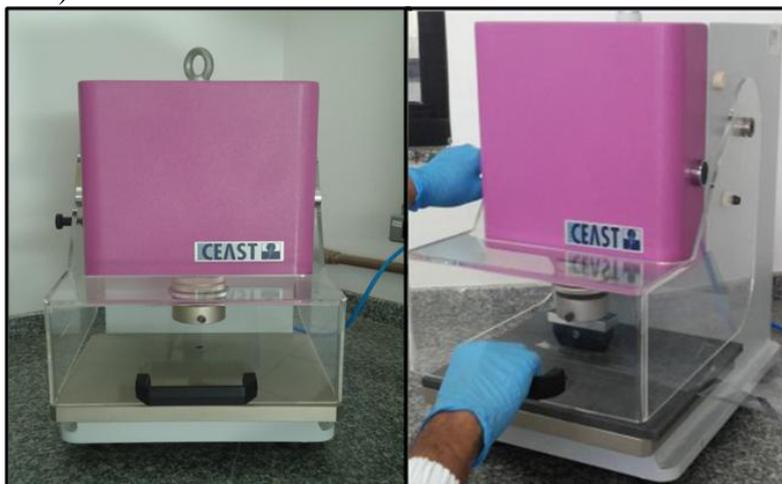
A espessura dos filmes foi mensurada com micrômetro digital da marca Digimess, em dez diferentes pontos de cada filme avaliado.

2.3.5.3 Propriedades mecânicas

Os ensaios de tração mecânica dos filmes (resistência à tração, alongação na ruptura e módulo de elasticidade) foram realizados no Laboratório de Tecnologia da Biomassa da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Fortaleza - CE.

O corte dos filmes para a realização dos ensaios de tração foi realizado com o auxílio de prensa estampadora pneumática Marca CEAST (FIGURA 7), com pressão de operação 7 bar, após o corte todas as amostras foram denominadas de corpos de prova com comprimento de 63,24 mm e largura de 12,86 mm.

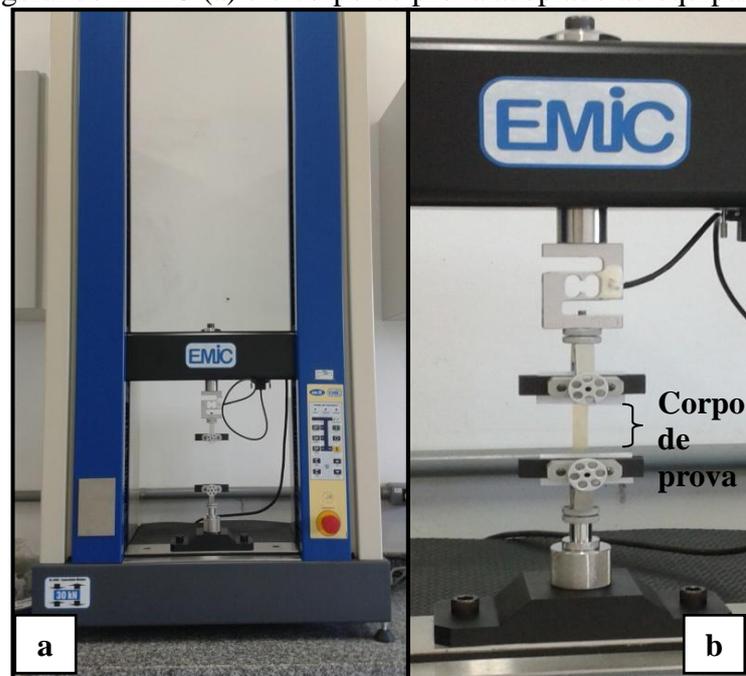
Figura 7 - Prensa estampadora pneumática utilizada para corte dos filmes (corpos de prova)



Fonte: Própria do autor (2016).

Os filmes antes da realização dos ensaios de tração foram acondicionados em dessecador contendo nitrato de magnésio hexahidratado ($Mg(NO_3)_2 \times 6H_2O$) para mantê-los em ambiente com umidade relativa e temperatura, respectivamente, de $50 \pm 5\%$ e $24 \pm 2^\circ C$, por no mínimo 40 horas. Nos ensaios de tração, os corpos de prova foram afixados por meio de garras acopladas a uma travessa móvel da Máquina Universal de Ensaio (EMIC, modelo DL 3000), com uma célula de carga de 100 N (FIGURA 8), seguindo as orientações da ASTM-D-882-91 (1991). Sendo a taxa de deformação de tração controlada pelo mecanismo de direcionamento, enquanto a tensão de tração sustentada pela amostra foi registrada pela célula de carga, ambos acoplados à travessa fixa. A velocidade de tracionamento utilizada foi de 50 mm/min e a distância inicial entre as garras foi de 30 mm. Os ensaios foram realizados em cinco repetições para cada amostra.

Figura 8 – Vista geral do EMIC (a) e o corpo de prova acoplado ao equipamento (b).



Fonte: Própria do autor (2016).

A resistência à tração pode ser definida como a tensão máxima que um material pode suportar ao ser alongado antes de ocorrer à ruptura, a elongação na ruptura representa a capacidade máxima de alongamento de um filme e o módulo de elasticidade ou módulo de Young está relacionado à rigidez do material utilizado no filme.

2.3.5.4 Cor e poacidade

A cor dos filmes foi determinada com auxílio de colorímetro digital (Konica Minolta) no Laboratório de Indústria e Processos, na Universidade do Minho, Portugal. Uma placa de cor branca foi utilizada como um padrão de calibração e como base para as medições de cor dos filmes. Os valores dos parâmetros cromáticos L* (luminosidade/brilho), a* (do vermelho ao verde) e b* (do azul ao amarelo) foram determinados de acordo com o sistema CIELab e mensurados em nove pontos de cada amostra de filme.

A opacidade dos filmes também foi determinada com auxílio de colorímetro Digital (Konica Minolta) e segundo a escala de cores Hunterlab. De acordo com este método, a opacidade (Y) foi calculada como a razão entre a opacidade de cada amostra sobre o padrão preto (YB) e a opacidade de cada amostra no padrão branco (YW). As medições foram realizadas em nove pontos de cada filme e os resultados expressos em porcentagem de acordo com a equação 2.

$$\text{Opacidade (\%)} = \frac{YB}{YW} \times 100 \quad (2)$$

2.3.6 Atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais

2.3.6.1 Cepas bacterianas

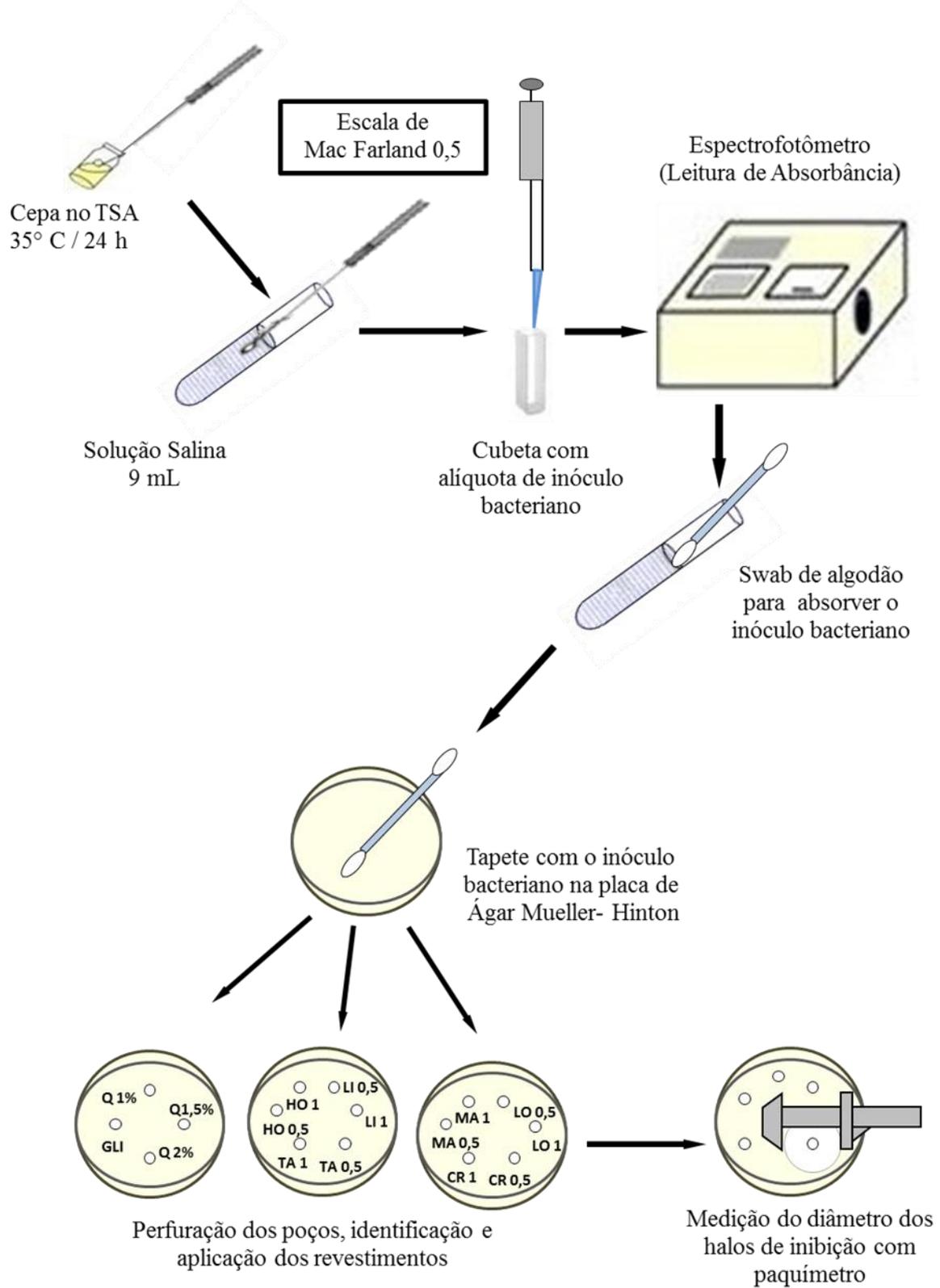
Primeiramente foi testada a atividade antibacteriana dos óleos essenciais puros (cravo, hortelã, limão, louro, manjeriço e tangerina) pelo método de difusão em ágar de acordo com a *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). Esta metodologia frente às cepas padrões de bactérias (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ATCC 13076 e *Vibrio parahaemolyticus* IOC 18950). Como controle positivo foi utilizado ampicilina (10mcg) e glicerol (Marca Dinâmica) como controle negativo.

A atividade antimicrobiana dos 39 revestimentos de quitosana e óleos essenciais foi determinada pela mesma metodologia de difusão em ágar utilizada nos óleos essenciais, também frente às cepas padrões de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ATCC 13076 e *Vibrio parahaemolyticus* IOC 18950.

2.3.6.2 Inóculos bacterianos e a técnica de difusão em Agar

Conforme a CLSI (2013) os inóculos bacterianos a partir das cepas padrões crescidos em Agar Triptona de Soja (TSA) por 24h/35 °C foram homogeneizados em 9 mL de solução salina 0,85% de cloreto de sódio (p/v) para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e 9 mL de solução salina 1% de cloreto de sódio (p/v) para *Vibrio parahaemolyticus*. A absorvância dos inóculos bacterianos foi mensurada em espectrofotômetro (Micronal), com comprimento de onda de 625nm e ajustada a uma turbidez óptica (0,08 – 0,10), equivalente a 0,5 na escala de McFarland, comparável a uma solução em suspensão com aproximadamente 1×10^8 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC / mL). Em seguida com o auxílio de um “swab” estéril o inóculo bacteriano homogeneizado foi espalhado uniformemente sobre a superfície de placas de petri contendo Agar Mueller-Hinton. Sendo os poços (Ø6mm) perfurados com auxílio de perfurador esterilizado e uma alíquota de 35µL de cada óleo essencial e 150 µL de cada revestimento foi depositada em cada poço. Todos os testes foram realizados em duplicata e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 48 h. Após o período de incubação, foi verificada a presença ou não de halo transparente ao redor dos poços e cada halo transparente presente (indicativo de atividade antimicrobiana) foi medido com auxílio de paquímetro digital (Digimess) conforme esquematizado na Figura 9.

Figura 9 – Fluxograma da atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais - técnica de difusão em ágar.



Fonte: Própria do autor (2018)

2.3.7 Análise estatística

Os dados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foi utilizado para a comparação entre as médias ao nível de 5% de significância. Para a análise dos dados foi utilizado o software estatístico StatSoft STATISTICA versão 7.0.

2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Potencial hidrogeniônico (pH) dos revestimentos de quitosana e óleos essenciais

Os valores de pH das soluções filmogênicas (revestimentos) de quitosana e óleos essenciais estão dispostos na Tabela 1. Observa-se que os valores de pH dos revestimentos de quitosana dos grupos 1% Q, 1,5% Q e 2% Q acrescidos ou não de óleos essenciais tiveram uma variação de 3,83 a 4,56, evidenciando um aumento do valor de pH de acordo com a maior concentração de quitosana.

Tabela 1 – Valores de pH (média \pm desvio padrão) dos revestimentos de quitosana e óleos essenciais produzidos em laboratório.

ÓLEO (%)	REVESTIMENTOS (pH)		
	1% Q	1,5% Q	2% Q
Sem óleo	3,85 \pm 0,01 ^{cd}	4,13 \pm 0,01 ^b	4,52 \pm 0,03 ^a
CR 0,5%	3,84 \pm 0,01 ^{cd}	4,14 \pm 0,01 ^b	4,56 \pm 0,01 ^a
CR 1%	3,89 \pm 0,01 ^c	4,17 \pm 0,01 ^b	4,51 \pm 0,01 ^a
HO 0,5%	3,88 \pm 0,03 ^c	4,18 \pm 0,01 ^b	4,51 \pm 0,01 ^a
HO 1%	3,90 \pm 0,02 ^c	4,15 \pm 0,01 ^b	4,54 \pm 0,01 ^a
LI 0,5 %	3,89 \pm 0,01 ^c	4,17 \pm 0,01 ^b	4,54 \pm 0,01 ^a
LI 1 %	3,90 \pm 0,01 ^c	4,15 \pm 0,01 ^b	4,52 \pm 0,01 ^a
LO 0,5%	3,85 \pm 0,02 ^{cd}	4,17 \pm 0,01 ^b	4,55 \pm 0,01 ^a
LO 1%	3,83 \pm 0,02 ^{cd}	4,15 \pm 0,01 ^b	4,52 \pm 0,01 ^a
MA 0,5%	3,84 \pm 0,01 ^{cd}	4,17 \pm 0,01 ^b	4,54 \pm 0,01 ^a
MA 1%	3,83 \pm 0,01 ^{cd}	4,15 \pm 0,01 ^b	4,51 \pm 0,01 ^a
TA 0,5 %	3,89 \pm 0,02 ^c	4,16 \pm 0,01 ^b	4,52 \pm 0,01 ^a
TA 1 %	3,83 \pm 0,01 ^{cd}	4,18 \pm 0,01 ^b	4,55 \pm 0,01 ^a

Q– Quitosana; CR - Óleo essencial de cravo; HO - Óleo essencial de hortelã, LI – Óleo essencial de limão; LO – Óleo essencial de louro; MA – Óleo essencial de manjeriçã; TA – Óleo essencial de tangerina; Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam que existe diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos.

Em relação aos diferentes óleos essenciais e as concentrações utilizadas (0,5 e 1%), não foram observadas grandes alterações, pois os revestimentos apresentaram valores próximos no interior de cada grupo (1% Q, 1,5% Q e 2% Q). Sendo possível observar que os revestimentos de quitosana 1% 1,5% e 2% acrescidos ou não de óleos de essenciais apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$) entre os grupos. Os revestimentos do grupo 1% Q não apresentaram diferenças significativas em relação ao pH no interior do grupo ($p>0,05$). O mesmo comportamento ocorreu com os revestimentos dos grupos 1,5% Q e 2% Q que também não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) nos valores de pH no interior

de cada grupo. Percebe-se nitidamente que a concentração de quitosana teve papel fundamental nos valores de pH dos revestimentos e as concentrações de óleos essenciais (0,5 e 1%), não causou alterações significativas. Fernández-Pan *et al.* (2015) em estudo com filmes de quitosana pura e quitosana incorporados com carvacrol observaram que as soluções filmogênicas apresentaram valores de pH em torno de 4, valores estes semelhantes aos encontrados no presente estudo.

2.4.2 Solubilidade, permeabilidade ao vapor de água e espessura dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais

Os valores de solubilidade, permeabilidade do vapor de água e espessura dos filmes de quitosana e óleos essenciais estão representados nas Tabelas 2, 3 e 4 respectivamente. Os filmes de quitosana 1% 1,5% e 2% acrescidos ou não de óleos essenciais apresentaram uma variação na solubilidade de 16,14 a 33,59% conforme representado na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores de solubilidade (média \pm desvio padrão) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.

ÓLEO (%)	Solubilidade (%)		
	1% Q	1,5% Q	2% Q
Sem óleo	16,14 \pm 0,72 ^q	25,48 \pm 0,48 ^{fg hijlmn}	27,53 \pm 0,50 ^{bcdefghij}
CR 0,5%	19,02 \pm 1,07 ^{pq}	31,99 \pm 2,38 ^{abc}	27,92 \pm 2,54 ^{bcdefghi}
CR 1%	22,90 \pm 0,34 ^{ijlmnop}	33,59 \pm 2,64 ^a	21,11 \pm 1,15 ^{nopq}
HO 0,5%	27,20 \pm 2,33 ^{cdefghij}	22,96 \pm 0,72 ^{ijlmnop}	27,95 \pm 0,83 ^{bcdefghi}
HO 1%	30,36 \pm 0,93 ^{abcdef}	24,25 \pm 2,23 ^{ghijklmn}	26,45 \pm 2,24 ^{defghijlm}
LI 0,5 %	19,17 \pm 0,40 ^{opq}	25,39 \pm 1,97 ^{fg hijlmn}	24,45 \pm 1,10 ^{ghijklmn}
LI 1 %	24,31 \pm 1,28 ^{ghijklmn}	28,15 \pm 1,01 ^{bcdefgh}	25,65 \pm 1,82 ^{defghijlmn}
LO 0,5%	27,26 \pm 1,67 ^{cdefghij}	32,58 \pm 0,75 ^{ab}	21,40 \pm 1,47 ^{mnop}
LO 1%	25,70 \pm 2,43 ^{defghijklmn}	30,62 \pm 2,20 ^{abcde}	21,82 \pm 1,74 ^{lmnop}
MA 0,5%	27,58 \pm 0,73 ^{bcdefghij}	24,82 \pm 1,50 ^{ghijklmn}	28,89 \pm 0,30 ^{abcdefg}
MA 1%	23,39 \pm 0,29 ^{hijklmnop}	26,53 \pm 0,92 ^{defghijl}	24,52 \pm 1,91 ^{ghijklmn}
TA 0,5 %	22,57 \pm 1,82 ^{ijlmnop}	25,39 \pm 1,69 ^{fg hijlmn}	25,59 \pm 1,59 ^{efghijklmn}
TA 1 %	27,54 \pm 1,71 ^{bcdefghij}	30,13 \pm 0,63 ^{abcdef}	30,74 \pm 0,70 ^{abcd}

Q – Quitosana; CR - Oléo essencial de cravo; HO - Óleo essencial de hortelã, LI – Oléo essencial de limão; LO – Óleo essencial de louro; MA – Óleo essencial de manjeriço; TA – Óleo essencial de tangerina; Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam que existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

Pode-se observar que os filmes de quitosana sem a incorporação de óleo essencial apresentaram acréscimo na solubilidade conforme o aumento da concentração de quitosana.

Uma maior solubilidade em água pode melhorar a biodegradabilidade do filme embora possa limitar sua aplicação em alimentos com alto teor de umidade (SINGH; SHARMA, 2008). Pois alimentos com grande quantidade de água requerem filmes que apresentem baixa solubilidade.

Em relação aos diferentes óleos essenciais (cravo, hortelã, limão, louro, manjerição e tangerina) nas concentrações de 0,5 e 1% a solubilidade apresentou um comportamento distinto entre os grupos de filmes (1% Q, 1,5% Q e 2% Q). Os filmes do grupo 1% Q apresentaram um acréscimo na solubilidade com o aumento da concentração de óleo essencial nos filmes com óleo de cravo, hortelã, limão e tangerina e comportamento contrário nos filmes com óleo essencial de louro e manjerição. No grupo 1,5% Q, os filmes com óleo essencial de cravo, hortelã, limão, manjerição e tangerina apresentaram um aumento da solubilidade de acordo com a maior concentração de óleo essencial e os filmes com óleo de louro apresentaram comportamento inverso. E conforme o grupo 2% Q, o aumento da solubilidade em relação à maior concentração de óleo essencial ocorreu nos filmes com óleo de limão, tangerina e louro, sendo observado decréscimo na solubilidade conforme a maior concentração de óleo essencial nos filmes com óleo de cravo, hortelã e manjerição.

De acordo com os valores de solubilidade observamos que o filme de 1% de quitosana (sem adição de óleo essencial) registrou a menor de solubilidade 16,14% e apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com todos os filmes do grupo 1,5% Q e quase todos os filmes adicionados de óleos essenciais dos grupos 1% Q e 2% Q, exceto os filmes adicionados de óleo de cravo (1% Q - CR 0,5% e 2% Q - CR 1%) e limão (1% Q - LI 0,5%) que não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) com o filme de 1% de quitosana (sem adição de óleo essencial).

Assim verificou-se que a solubilidade dos filmes foi influenciada pelas concentrações de quitosana e óleos essenciais, os filmes de 1,5% de quitosana com óleo essencial de cravo (1%) e louro (0,5%) apresentaram os maiores valores de solubilidade e o filme de 1% de quitosana (sem adição de óleo essencial) apresentou o menor valor de solubilidade. Hosseini *et al.* (2009) em estudo com filmes de 2% de quitosana e óleos essenciais de tomilho, cravo e canela nas concentrações de 0,5%, 1% e 1,5% observaram a diminuição da solubilidade com o aumento da concentração dos óleos essenciais em questão. Souza *et al.* (2017) trabalhando com filmes de 1,5% de quitosana e 1% de óleos essenciais (alecrim, salvia, melaleuca, tomilho e gengibre), observaram que os filmes de quitosana adicionados de óleos essenciais de alecrim, salvia, melaleuca e tomilho obtiveram maior valor

de solubilidade que o filme com apenas quitosana, mas um comportamento inverso ocorreu com o filme de quitosana com gengibre que apresentou o menor valor de solubilidade entre os filmes estudados. E Hafsa *et al.* (2016) ao avaliarem filmes de 2% de quitosana e óleo essencial de eucalipto em diferentes concentrações (1%, 2%, 3% e 4%) verificaram que o filme de quitosana (sem adição de óleo essencial) apresentou o maior valor de solubilidade e conforme a incorporação e aumento da concentração de óleo essencial ocorreu uma diminuição na solubilidade.

Os valores de permeabilidade do vapor de água (PVA) estão representados na Tabela 3 e apresentaram uma variação de 0,93 a 2,02 g/m.dia.atm.

Tabela 3 – Valores de permeabilidade ao vapor de água (média \pm desvio padrão) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.

ÓLEO (%)	Permeabilidade ao vapor de água – PVA (g/m.dia.atm)		
	1% Q	1,5% Q	2% Q
Sem óleo	1,40 \pm 0,09 ^{cdefghi}	1,43 \pm 0,09 ^{bcdefghi}	1,77 \pm 0,06 ^{abcd}
CR 0,5%	1,39 \pm 0,09 ^{cdefghi}	1,40 \pm 0,14 ^{cdefghi}	1,87 \pm 0,31 ^{ab}
CR 1%	1,17 \pm 0,15 ^{defghi}	1,47 \pm 0,16 ^{bcdefghi}	2,02 \pm 0,47 ^a
HO 0,5%	1,22 \pm 0,13 ^{defghi}	1,15 \pm 0,14 ^{defghi}	1,47 \pm 0,24 ^{bcdefghi}
HO 1%	1,09 \pm 0,15 ^{efghi}	1,43 \pm 0,09 ^{bcdefghi}	1,60 \pm 0,09 ^{abcdefg}
LI 0,5 %	1,08 \pm 0,04 ^{efghi}	1,58 \pm 0,36 ^{abcdefgh}	1,65 \pm 0,30 ^{abcdeef}
LI 1 %	1,05 \pm 0,03 ^{fghi}	1,35 \pm 0,11 ^{cdefghi}	2,02 \pm 0,80 ^a
LO 0,5%	1,26 \pm 0,21 ^{defghi}	1,47 \pm 0,10 ^{bcdefghi}	1,55 \pm 0,09 ^{abcdefghi}
LO 1%	1,32 \pm 0,10 ^{defghi}	1,48 \pm 0,04 ^{bcdefghi}	1,35 \pm 0,04 ^{cdefghi}
MA 0,5%	0,97 \pm 0,35 ^{hi}	1,72 \pm 0,04 ^{abcd}	1,73 \pm 0,20 ^{abcd}
MA 1%	1,00 \pm 0,19 ^{ghi}	1,39 \pm 0,17 ^{cdefghi}	1,68 \pm 0,08 ^{abcde}
TA 0,5 %	0,93 \pm 0,22 ⁱ	1,14 \pm 0,12 ^{defghi}	1,37 \pm 0,05 ^{cdefghi}
TA 1 %	0,96 \pm 0,07 ^{hi}	1,27 \pm 0,26 ^{dfghi}	1,44 \pm 0,21 ^{bdefghi}

Q – Quitosana; CR - Óleo essencial de cravo; HO - Óleo essencial de hortelã, LI – Óleo essencial de limão; LO – Óleo essencial de louro; MA – Óleo essencial de manjeriço; TA – Óleo essencial de tangerina; Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam que existe diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos.

Em termos de permeabilidade ao vapor de água o filme de 1% de quitosana com 0,5 de óleo essencial de tangerina apresentou o menor valor de permeabilidade (0,93 g/m.dia.atm) e os filmes de 2% de quitosana com 1% óleo essencial de cravo e limão apresentaram o maior valor de permeabilidade (2,02 g/m.atm.dia). Sendo possível verificar que os filmes de quitosana (sem o acréscimo de óleo essencial) apresentaram valores crescentes de permeabilidade ao vapor de água conforme o aumento da concentração de

quitosana. Em contrapartida Fráguas *et al.* (2015) observaram o comportamento contrário em estudo com três concentrações de quitosana (0,5%, 1% e 1,5%), ou seja quanto maior a concentração de quitosana menor o valor de permeabilidade ao vapor de água.

Em termos de PVA verificou-se que a adição dos diferentes óleos essenciais (cravo, hortelã, limão, louro, manjerição e tangerina) nas concentrações de 0,5 e 1% apresentou um comportamento diverso nos três grupos de filmes de quitosana (1% Q, 1,5% Q e 2% Q). No grupo 1% Q ocorreu um aumento na permeabilidade ao vapor de água de acordo com o aumento da concentração de óleo essencial nos filmes com óleo de louro, manjerição e tangerina e um comportamento contrário nos filmes com óleo de cravo, hortelã e limão. De acordo com o grupo 1,5% Q ocorreu o aumento da PVA conforme a maior concentração de óleo essencial nos filmes com óleo de cravo, hortelã, louro e tangerina e uma diminuição na permeabilidade ao vapor de água com o aumento da concentração de óleo essencial nos filmes com óleo de manjerição e limão. Já no grupo 2% Q, os filmes com óleos essenciais de cravo, hortelã, limão e tangerina apresentaram acréscimo na PVA de acordo com o aumento da concentração de óleo essencial e os filmes com óleo de louro e manjerição apresentaram comportamento contrário. Os filmes de quitosana de 1%, 1,5% e 2% (sem adição de óleos essenciais) não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre si. Mas separadamente o filme de 1% de quitosana apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com os filmes de 2% de quitosana adicionados de óleo essencial de cravo (2% Q – CR 0,5% e 2% Q - CR 1%) e limão (2% Q – LI 1%). O filme de 1,5% de quitosana (sem adição de óleo essencial) apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com os filmes de 2% de quitosana adicionados de óleo essencial de cravo (2% Q - CR 1%) e limão (2% Q – LI 1%). E o filme de 2% de quitosana (sem adição de óleo essencial) apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com os filmes de 1% de quitosana adicionados de óleos essenciais de hortelã (1%), limão (0,5% e 1%), manjerição (0,5% e 1%) e tangerina (0,5% e 1%).

O desempenho da permeabilidade ao vapor de água nos filmes de quitosana pode ser provavelmente atribuído à presença dos grupos amino e hidroxila, que fornecem locais de ligação para as moléculas de água (BOURTOOM; CHINNAN, 2008; SRINIVASA RAMESH; THARANATHAN, 2007). A permeabilidade ao vapor de água depende da umidade relativa do ar e das propriedades higroscópicas do material estudado (LAROTONDA *et al.*, 2005). Em estudo com filmes de 2% de quitosana e óleos essenciais de tomilho, cravo e canela nas concentrações de 0,5%, 1% e 1,5% Hosseini *et al.* (2009) observaram um aumento da permeabilidade ao vapor de água conforme a incorporação dos óleos essenciais (tomilho,

cravo e canela) aos filmes de quitosana e estes filmes incorporados com óleos essenciais apresentaram diminuição da permeabilidade ao vapor de água com o aumento da concentração de óleo essencial. A incorporação de óleos essenciais aos filmes de quitosana pode causar uma diminuição nos valores de permeabilidade ao vapor de água (SHEN; KAMDEM, 2015). Perdones *et al.* (2016) observaram em filmes de 1% de quitosana e óleos essenciais de tomilho e manjerição (0,5% e 1%) uma diminuição nos valores de permeabilidade ao vapor de água conforme a maior concentração de óleo essencial. E Pereda *et al.* (2012) em filmes de quitosana com diferentes concentrações de óleo de oliva também registraram uma diminuição da permeabilidade ao vapor de água conforme a incorporação e aumento do teor lipídico.

As espessuras dos filmes estão representadas na Tabela 4 e obtiveram uma variação de 0,060 a 0,147 mm.

Tabela 4 – Valores de espessura (média \pm desvio padrão) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.

ÓLEO (%)	Espesura (mm)		
	1% Q	1,5% Q	2% Q
Sem óleo	0,069 \pm 0,01 ^{fgh}	0,103 \pm 0,01 ^{abcdefgh}	0,146 \pm 0,03 ^a
CR 0,5%	0,065 \pm 0,02 ^{gh}	0,112 \pm 0,01 ^{abcdefgh}	0,142 \pm 0,03 ^{ab}
CR 1%	0,064 \pm 0,03 ^{gh}	0,102 \pm 0,01 ^{abcdefgh}	0,141 \pm 0,01 ^{abc}
HO 0,5%	0,085 \pm 0,02 ^{efgh}	0,110 \pm 0,02 ^{abcdefgh}	0,135 \pm 0,02 ^{abcd}
HO 1%	0,079 \pm 0,01 ^{efgh}	0,107 \pm 0,02 ^{abcdefgh}	0,134 \pm 0,02 ^{abcd}
LI 0,5 %	0,062 \pm 0,01 ^{gh}	0,116 \pm 0,02 ^{abcdefgh}	0,146 \pm 0,02 ^a
LI 1 %	0,063 \pm 0,02 ^{gh}	0,108 \pm 0,02 ^{abcdefgh}	0,147 \pm 0,02 ^a
LO 0,5%	0,070 \pm 0,02 ^{fgh}	0,112 \pm 0,03 ^{abcdefgh}	0,133 \pm 0,02 ^{abcd}
LO 1%	0,076 \pm 0,02 ^{efgh}	0,111 \pm 0,01 ^{abcdefgh}	0,129 \pm 0,01 ^{abcd}
MA 0,5%	0,067 \pm 0,02 ^{fgh}	0,112 \pm 0,01 ^{abcdefgh}	0,143 \pm 0,01 ^{ab}
MA 1%	0,073 \pm 0,03 ^{efgh}	0,101 \pm 0,01 ^{bcdefgh}	0,140 \pm 0,03 ^{abc}
TA 0,5 %	0,060 \pm 0,02 ^h	0,093 \pm 0,01 ^{cdefgh}	0,129 \pm 0,01 ^{abcd}
TA 1 %	0,061 \pm 0,02 ^{gh}	0,103 \pm 0,02 ^{abcdefgh}	0,133 \pm 0,02 ^{abcd}

Q – Quitosana; CR - Oléo essencial de cravo; HO - Óleo essencial de hortelã, LI – Oléo essencial de limão; LO – Óleo essencial de louro; MA – Óleo essencial de manjerição; TA – Óleo essencial de tangerina; Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam que existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

Os valores de espessura aumentaram de acordo com a maior concentração de quitosana. Fráguas *et al.* (2015) estudando filmes com três concentrações de quitosana (0,5%, 1% e 1,5%) também observaram o aumento da espessura conforme a maior concentração de quitosana.

A adição dos óleos essenciais (0,5% e 1%) aos filmes de quitosana teve um papel diversificado em relação às espessuras dos filmes em todas as concentrações. No grupo 1% Q houve um leve aumento das espessuras em relação a maior concentração de óleo essencial nos filmes com óleo essencial de limão, louro, manjerição e tangerina e uma pequena diminuição das espessuras nos filmes com óleo de cravo e hortelã. O grupo 1,5% Q demonstrou que apenas os filmes com óleo essencial de tangerina apresentam um pequeno aumento nos valores de espessura em relação a maior concentração de óleo essencial e os demais filmes apresentaram uma leve diminuição da espessura em relação a maior concentração de óleo essencial. E no grupo 2% Q, os filmes com os óleos essenciais de limão e tangerina apresentaram um pequeno acréscimo na espessura de acordo com a maior concentração de óleo essencial, tendo os demais filmes apresentado comportamento inverso onde a maior concentração de óleo adicionada aos filmes causou um leve decréscimo na espessura dos mesmos. Pelos valores de espessura registrados foi possível perceber que os filmes do grupo 1% Q apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) com os filmes do grupo 2% Q. Perdones *et al.* (2016) em estudo com filmes de quitosana incorporados com óleos essenciais de manjerição e tomilho nas concentrações de 0,5% e 1% observaram o aumento da espessura dos filmes conforme a maior concentração de óleo essencial.

Observou-se que a espessura e a permeabilidade ao vapor de água em geral apresentaram o mesmo comportamento, pois seus valores aumentaram de acordo com a maior concentração de quitosana. O aumento da taxa de permeabilidade ao vapor de água dos filmes com o aumento da espessura pode indicar uma afinidade do filme à água atribuída aos compostos hidrofílicos (SKURTYS *et al.*, 2012).

2.4.3 Propriedades mecânicas dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais

Os valores referentes às propriedades mecânicas dos filmes de quitosana e óleos essenciais podem ser observados nas Tabelas 5, 6 e 7. Sendo que essas propriedades mecânicas foram representadas pelos valores de resistência à tração, alongação na ruptura e módulo de elasticidade. Os valores de resistência a tração dos filmes variaram de 0,41 a 8,59 MPa e estão representados na Tabela 5. Na alongação na ruptura (Tabela 6) os valores apresentaram variação de 37,97 a 146,78%. E os valores de módulo de elasticidade (Tabela 7) apresentaram variação de 1,45 a 12,05 MPa.

Tabela 5 – Valores de resistência à tração (média ± desvio padrão) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.

ÓLEO (%)	Resistência à tração (Mpa)		
	1% Q	1,5% Q	2% Q
Sem óleo	0,74 ± 0,31 ^{ij}	1,41 ± 0,35 ^{hij}	5,16 ± 0,38 ^{bc}
CR 0,5%	0,88 ± 0,21 ^{ij}	1,68 ± 0,31 ^{ghi}	3,47 ± 0,36 ^{de}
CR 1%	0,69 ± 0,31 ^{ij}	0,98 ± 0,31 ^{ij}	2,61 ± 0,36 ^{efg}
HO 0,5%	1,36 ± 0,21 ^{hij}	3,67 ± 0,36 ^{de}	7,95 ± 0,34 ^a
HO 1%	1,18 ± 0,15 ^{hij}	3,31 ± 0,57 ^e	5,57 ± 0,39 ^{bc}
LI 0,5 %	0,35 ± 0,01 ^j	3,28 ± 0,24 ^{ef}	5,16 ± 0,93 ^{bc}
LI 1 %	0,50 ± 0,12 ^j	3,48 ± 0,49 ^{de}	4,58 ± 0,71 ^{cd}
LO 0,5%	0,84 ± 0,14 ^{ij}	3,22 ± 0,64 ^{ef}	5,84 ± 0,38 ^b
LO 1%	0,79 ± 0,29 ^{ij}	1,15 ± 0,36 ^{hij}	5,03 ± 0,38 ^{bc}
MA 0,5%	1,01 ± 0,14 ^{ij}	3,47 ± 0,62 ^{de}	7,67 ± 0,92 ^a
MA 1%	1,27 ± 0,18 ^{hij}	3,62 ± 0,18 ^{de}	8,59 ± 1,09 ^a
TA 0,5 %	0,41 ± 0,09 ^j	1,03 ± 0,21 ^{hij}	2,51 ± 0,15 ^{efg}
TA 1 %	0,85 ± 0,29 ^{ij}	2,16 ± 0,34 ^{fgh}	4,58 ± 1,00 ^{cd}

Q – Quitosana; CR - Oléo essencial de cravo; HO - Óleo essencial de hortelã, LI – Oléo essencial de limão; LO – Óleo essencial de louro; MA – Óleo essencial de manjeriço; TA – Óleo essencial de tangerina; Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam que existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 6 – Valores de alongação na ruptura (média ± desvio padrão) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais

ÓLEO (%)	Alongação na ruptura (%)		
	1% Q	1,5% Q	2% Q
Sem óleo	55,03 ± 8,14 ^{mn}	78,97 ± 7,49 ^{hij}	84,60 ± 5,04 ^{ghi}
CR 0,5%	72,91 ± 4,86 ^{ijl}	146,78 ± 4,33 ^a	112,99 ± 9,36 ^{cd}
CR 1%	50,95 ± 6,30 ^{mno}	143,61 ± 8,82 ^a	112,45 ± 6,75 ^{cd}
HO 0,5%	56,22 ± 2,76 ^{lmn}	108,08 ± 6,53 ^{cdef}	99,58 ± 6,70 ^{cdefg}
HO 1%	55,27 ± 8,13 ^{mn}	97,74 ± 2,87 ^{defg}	74,07 ± 5,46 ^{ij}
LI 0,5 %	37,97 ± 4,27 ^o	132,48 ± 9,43 ^{ab}	110,04 ± 6,80 ^{cde}
LI 1 %	49,20 ± 7,03 ^{mno}	138,47 ± 8,97 ^a	108,25 ± 7,36 ^{cdef}
LO 0,5%	48,91 ± 1,87 ^{mno}	88,51 ± 7,69 ^{ghi}	72,45 ± 3,83 ^{ijl}
LO 1%	44,33 ± 8,62 ^{no}	72,18 ± 9,08 ^{ijl}	64,50 ± 3,71 ^{ijlm}
MA 0,5%	51,55 ± 3,59 ^{mno}	106,11 ± 6,94 ^{cdef}	93,81 ± 6,30 ^{efgh}
MA 1%	51,92 ± 4,42 ^{mno}	116,37 ± 5,90 ^{bc}	101,15 ± 8,30 ^{cdefg}
TA 0,5 %	39,77 ± 8,47 ^{no}	78,18 ± 9,50 ^{hij}	45,35 ± 2,42 ^{no}
TA 1 %	53,83 ± 5,08 ^{mno}	92,11 ± 7,14 ^{fgh}	72,07 ± 9,18 ^{ijl}

Q – Quitosana; CR - Oléo essencial de cravo; HO - Óleo essencial de hortelã, LI – Oléo essencial de limão; LO – Óleo essencial de louro; MA – Óleo essencial de manjeriço; TA – Óleo essencial de tangerina; Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam que existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 7 – Valores de módulo de elasticidade (média \pm desvio padrão) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.

ÓLEO (%)	Módulo de elasticidade (Mpa)		
	1% Q	1,5% Q	2% Q
Sem óleo	2,55 \pm 1,03 ^{ijklmno}	2,64 \pm 0,24 ^{ijklmno}	9,16 \pm 0,58 ^c
CR 0,5%	2,34 \pm 0,42 ^{lmno}	2,77 \pm 0,51 ^{ijklmno}	6,04 \pm 0,53 ^{ef}
CR 1%	2,32 \pm 0,89 ^{lmno}	1,52 \pm 0,40 ^{no}	4,64 \pm 0,55 ^{fgh}
HO 0,5%	4,70 \pm 0,68 ^{fgh}	5,41 \pm 0,64 ^{efg}	11,50 \pm 0,49 ^a
HO 1%	4,60 \pm 0,35 ^{fgh}	3,92 \pm 0,82 ^{ghijl}	9,63 \pm 0,57 ^{bc}
LI 0,5 %	1,57 \pm 0,37 ^{no}	3,04 \pm 0,18 ^{hijlmno}	6,66 \pm 0,92 ^{de}
LI 1 %	1,94 \pm 0,53 ^{mno}	3,27 \pm 0,36 ^{hijlm}	5,24 \pm 0,84 ^{efg}
LO 0,5%	3,19 \pm 0,54 ^{hijlmn}	5,14 \pm 0,68 ^{efg}	11,12 \pm 0,70 ^{ab}
LO 1%	3,16 \pm 1,25 ^{hijlmn}	2,88 \pm 0,31 ^{ijklmno}	11,07 \pm 0,47 ^{ab}
MA 0,5%	3,79 \pm 0,44 ^{ghijl}	4,05 \pm 0,12 ^{ghij}	11,27 \pm 0,99 ^{ab}
MA 1%	4,66 \pm 0,63 ^{fgh}	5,11 \pm 0,45 ^{efg}	12,05 \pm 0,86 ^a
TA 0,5 %	1,45 \pm 0,26 ^o	2,68 \pm 0,41 ^{ijklmno}	4,60 \pm 0,45 ^{fgh}
TA 1 %	2,83 \pm 0,60 ^{ijklmno}	4,07 \pm 0,74 ^{ghij}	8,33 \pm 1,90 ^{cd}

Q – Quitosana; CR - Oléo essencial de cravo; HO - Óleo essencial de hortelã, LI – Óleo essencial de limão; LO – Óleo essencial de louro; MA – Óleo essencial de manjeriço; TA – Óleo essencial de tangerina; Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam que existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

A resistência à tração, alongação na ruptura e módulo de elasticidade apresentaram aumento de valores nos filmes de quitosana (sem adição de óleos essenciais) de acordo com a maior concentração de quitosana. O aumento da concentração de quitosana pode propiciar maior resistência à tração, porém menor elasticidade, possivelmente devido ao aumento da rigidez nos filmes mais concentrados (LAMIM *et al.*, 2006). Conforme a adição dos diferentes óleos essenciais (cravo, hortelã, limão, louro, manjeriço e tangerina) e suas concentrações (0,5% e 1%) foi observado um comportamento heterogêneo nos valores de resistência à tração, alongação na ruptura e módulo de elasticidade em relação aos três grupos de filmes. Geralmente o desempenho mecânico de um filme depende do composto ativo e sua incorporação, bem como o tipo de matriz polimérica e a interação entre os diferentes componentes (TALÓN *et al.*, 2017).

Os filmes dos grupos 1% Q e 1,5% Q adicionados de óleos essenciais apresentaram um acréscimo nos valores de resistência à tração, alongação na ruptura e módulo de elasticidade em relação a maior concentração de óleo essencial nos filmes com óleo de limão, manjeriço e tangerina, sendo que os filmes com os demais óleos essenciais (cravo, hortelã e louro) apresentaram comportamento inverso, ou seja, na maior concentração

de óleo essencial ocorreu uma diminuição nos valores de resistência à tração, alongação na ruptura e módulo de elasticidade. Em relação ao grupo 2% Q, ocorreu um acréscimo na resistência à tração, alongação na ruptura e módulo de elasticidade de acordo com a maior concentração de óleo essencial nos filmes com óleo de manjerição e tangerina e os demais filmes apresentaram decréscimo nos valores de resistência à tração, alongação na ruptura e módulo de elasticidade em comparação a maior concentração de óleo essencial.

A resistência à tração é representada pela força máxima que um filme pode suportar contra uma tensão aplicada (PARK; ZHAO, 2004). Sendo fundamental para manter a integridade estrutural e a propriedade de barreira dos filmes (LIU *et al.*, 2017). Nos resultados de resistência à tração, observamos que os filmes de 1% e 1,5% de quitosana (sem adição de óleos essenciais) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) com todos os filmes de 2% de quitosana (grupo 2% Q) e também com os filmes de 1,5% de quitosana adicionados de óleos essenciais de hortelã (0,5% e 1%), limão (0,5% e 1%), manjerição (0,5% e 1%), louro (0,5%) e tangerina (1%).

Em estudo com filmes de 2% de quitosana e diferentes concentrações de óleo de oliva foi observado acréscimo nos valores de resistência à tração conforme a incorporação e o aumento da concentração lipídica (PEREDA, *et al.*, 2012). Souza *et al.* (2017) observaram que os filmes de 1,5 % de quitosana adicionados de 1% de óleos essenciais de alecrim, salvia, melaleuca e tomilho obtiveram maior valor de resistência a tração que o filme com apenas quitosana, mas um comportamento inverso ocorreu com o filme de quitosana com gengibre que apresentou menor resistência a tração que o filme de quitosana sem adição de óleos essenciais. De acordo com Hosseini *et al.* (2009) o valor de resistência à tração diminui com a incorporação e aumento da concentração dos óleos essenciais de tomilho e cravo aos filmes de quitosana, mas acontece o inverso com o filme de quitosana com canela que aumenta a resistência a tração com a sua incorporação e aumento da concentração. A resistência à tração nos filmes de 1% de quitosana com óleo essencial de tomilho (0,5% e 1%) apresentou pequeno aumento conforme a maior concentração de óleo essencial, porém nos filmes de 1% de quitosana com óleo essencial de manjerição (0,5% e 1%) ocorreu o comportamento contrário, com uma leve diminuição na resistência à tração com o aumento da concentração de óleo essencial (PERDONES *et al.*, 2016).

A alongação na ruptura pode ser definida como a capacidade máxima que um filme pode esticar-se antes da quebra (OZDEMIR; FLOROS, 2008). Para facilitar a

manipulação dos filmes é essencial uma flexibilidade apropriada (CHEN; LAI, 2008). Em relação a elongação na ruptura o filme de 1% de quitosana (sem adição de óleo essencial) apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com dois filmes adicionados de óleos essenciais do grupo 1% Q (1% Q – CR 0,5 % e 1% Q – LI 0,5%), com todos os filmes do grupo 1,5% Q e com quase todos os filmes do grupo 2% Q, exceto os filmes 2% Q – LO 1% e 2% Q – TA 0,5% que não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) com o filme de 1% de quitosana (sem adição de óleo essencial).

De acordo com Souza *et al.* (2017), os filmes de 1,5 % de quitosana adicionados de 1% de óleos essenciais de alecrim, melaleuca e tomilho apresentaram maior elongação na ruptura (flexibilidade) que o filme com apenas quitosana, mas os filmes de quitosana com 1% de óleo de salvia e gengibre apresentaram menor valor de elongação na ruptura que o filme de quitosana pura. Nos filmes de 2% quitosana a elongação na ruptura (flexibilidade) aumentou conforme a incorporação e o aumento da concentração de óleo de oliva (PEREDA, *et al.*, 2012). Conforme Hosseini *et al.* (2009) os filmes de 2% de quitosana apresentaram aumento na elongação na ruptura (flexibilidade) com a incorporação de óleos essenciais de tomilho e cravo, mas com o aumento da concentração desses óleos ocorreu um decréscimo nos valores de elongação na ruptura e em relação a incorporação e aumento da concentração do óleo essencial de canela ocorreu um decréscimo da elongação na ruptura. Nos filmes de 1% de quitosana e óleo essencial de tomilho (0,5% e 1%) a elongação na ruptura apresentou leve aumento conforme a maior concentração de óleo essencial, mas nos filmes de 1% de quitosana e óleo de manjerição (0,5% e 1%) ocorreu o comportamento contrário com pequena diminuição na elongação na ruptura com o aumento da concentração de óleo essencial (PERDONES *et al.*, 2016).

O módulo de elasticidade é um critério que caracteriza a rigidez de um material, ou seja, quanto maior o valor do módulo de elasticidade menor será a flexibilidade do filme (ROTTA; MINATTI; BARRETO, 2011). Conforme os valores de módulo de elasticidade os filmes de 1% e 1,5% de quitosana (sem adição de óleos essenciais) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) com todos os filmes de 2% de quitosana (grupo 2% Q) e também apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) com alguns filmes adicionados de óleos essenciais dos grupos 1% Q e 1,5% Q, representados pelos filmes 1% Q – HO 0,5%, 1% Q – HO 1%, 1% Q – MA 1%, 1,5% Q – HO 0,5%, 1,5% Q – LO 0,5% e 1,5% Q – MA 1%.

Pereda *et al.* (2012) observaram que os filmes de 2% de quitosana com diferentes concentrações de óleo de oliva apresentaram acréscimo no módulo de elasticidade (maior rigidez) conforme a incorporação e o aumento do teor lipídico. Os filmes de 1,5 % de quitosana adicionados de óleos essenciais de alecrim, melaleuca, tomilho e salvia apresentaram maior módulo de elasticidade (rigidez) que o filme com apenas quitosana, mas o filme de quitosana com óleo essencial de gengibre apresentou o comportamento inverso, com menor valor de módulo de elasticidade que os demais (SOUZA *et al.*, 2017). O módulo de elasticidade dos filmes de 1% de quitosana e óleo essencial de manjerição (0,5% e 1%) apresentou aumento conforme a maior concentração de óleo essencial, mas os filmes de 1% de quitosana e óleo essencial de tomilho (0,5% e 1%) apresentaram comportamento contrário com a diminuição do módulo de elasticidade conforme a maior concentração de óleo essencial (PERDONES *et al.*, 2016).

2.4.4 Cor e opacidade dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais

Os parâmetros cromáticos (L^* - a^* - b^*) e opacidade dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais estão representados nas Tabelas 8, 9, 10 e 11 respectivamente. A luminosidade (L^*) dos filmes de quitosana e óleos essenciais (Tabela 8) apresentou uma variação nos valores de 74,22 a 90,16. Em relação ao parâmetro cromático a^* (Tabela 9) foi possível observar uma variação de 0,45 a 7,73. Na Tabela 10 que representa o parâmetro cromático b^* foi observada uma variação nos valores de 19,61 a 49,41.

Tabela 8 – Valores do parâmetro cromático L* (média ± desvio padrão) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.

ÓLEO (%)	Cor – L*		
	1% Q	1,5% Q	2% Q
Sem óleo	85,27 ± 1,28 ^{cde}	84,99 ± 2,15 ^{cdef}	74,45 ± 1,17 ^{pq}
CR 0,5%	85,62 ± 1,55 ^{cde}	78,92 ± 1,27 ^{ijlm}	74,59 ± 1,24 ^{opq}
CR 1%	86,40 ± 0,60 ^{bcd}	79,14 ± 2,02 ^{ijlm}	75,24 ± 0,95 ^{nopq}
HO 0,5%	83,92 ± 2,58 ^{defg}	78,87 ± 2,58 ^{ijlm}	80,07 ± 1,85 ^{hijlm}
HO 1%	82,78 ± 1,09 ^{efgh}	77,74 ± 0,92 ^{ijlmnop}	77,58 ± 1,53 ^{ijlmnop}
LI 0,5 %	88,69 ± 1,12 ^{ab}	80,45 ± 1,04 ^{hijl}	77,80 ± 1,17 ^{ijlmnop}
LI 1 %	87,49 ± 1,14 ^{abc}	77,22 ± 3,11 ^{lmnopq}	74,22 ± 1,49 ^q
LO 0,5%	88,15 ± 2,02 ^{ab}	87,30 ± 0,77 ^{abc}	80,77 ± 2,06 ^{ghij}
LO 1%	87,59 ± 2,19 ^{abc}	82,25 ± 3,19 ^{efghi}	80,55 ± 3,96 ^{ghijl}
MA 0,5%	88,63 ± 1,71 ^{ab}	80,29 ± 1,74 ^{hijlm}	78,12 ± 0,88 ^{ijlmn}
MA 1%	83,84 ± 1,11 ^{defg}	76,96 ± 0,61 ^{mnopq}	77,39 ± 1,47 ^{ijlmnopq}
TA 0,5 %	90,16 ± 1,66 ^a	87,62 ± 3,22 ^{abc}	79,24 ± 3,68 ^{ijlm}
TA 1 %	89,40 ± 1,90 ^{ab}	79,90 ± 1,11 ^{hijlm}	77,26 ± 0,52 ^{lmnopq}

Q – Quitosana; CR – Óleo essencial de cravo; HO - Óleo essencial de hortelã, LI – Óleo essencial de limão; LO – Óleo essencial de louro; MA – Óleo essencial de manjeriço; TA – Óleo essencial de tangerina; Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam que existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 9 – Valores do parâmetro cromático a* (média ± desvio padrão) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.

ÓLEO (%)	Cor – a*		
	1% Q	1,5% Q	2% Q
Sem óleo	2,05 ± 0,51 ^{ijlm}	2,92 ± 0,31 ^{ij}	6,68 ± 0,76 ^{ab}
CR 0,5%	0,88 ± 0,64 ^m	4,42 ± 0,74 ^{defgh}	6,59 ± 0,60 ^{ab}
CR 1%	0,45 ± 0,20 ⁿ	3,88 ± 1,29 ^{efghi}	5,08 ± 0,47 ^{defgh}
HO 0,5%	2,05 ± 0,13 ^{ijlm}	4,19 ± 0,72 ^{defghi}	3,59 ± 0,96 ^{ghij}
HO 1%	2,90 ± 0,47 ^{ij}	5,05 ± 0,38 ^{defg}	5,00 ± 1,00 ^{defgh}
LI 0,5 %	1,20 ± 0,40 ^m	3,94 ± 0,69 ^{efghi}	5,52 ± 0,59 ^{bcde}
LI 1 %	1,39 ± 0,51 ^{lm}	6,00 ± 1,71 ^{bc}	7,73 ± 0,90 ^a
LO 0,5%	1,15 ± 0,53 ^m	1,27 ± 0,38 ^{lm}	3,56 ± 1,42 ^{ghij}
LO 1%	1,33 ± 0,53 ^{lm}	2,91 ± 1,86 ^{ijl}	3,69 ± 1,85 ^{efghij}
MA 0,5%	0,97 ± 0,33 ^m	4,19 ± 1,11 ^{defghi}	5,15 ± 0,64 ^{cdefg}
MA 1%	1,35 ± 0,46 ^{lm}	6,01 ± 0,32 ^{bc}	5,34 ± 0,98 ^{cdef}
TA 0,5 %	0,79 ± 0,89 ^m	2,04 ± 0,77 ^{ijlm}	4,40 ± 2,29 ^{defgh}
TA 1 %	1,02 ± 0,35 ^m	3,69 ± 0,55 ^{efghij}	5,73 ± 0,41 ^{bcd}

Q – Quitosana; CR – Óleo essencial de cravo; HO - Óleo essencial de hortelã, LI – Óleo essencial de limão; LO – Óleo essencial de louro; MA – Óleo essencial de manjeriço; TA – Óleo essencial de tangerina; Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam que existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 10 – Valores do parâmetro cromático b* (média ± desvio padrão) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.

ÓLEO (%)	Cor – b*		
	1% Q	1,5% Q	2% Q
Sem óleo	29,11 ± 1,91 ^m	33,61 ± 1,32 ^l	44,50 ± 1,20 ^{def}
CR 0,5%	35,13 ± 2,61 ^{jl}	45,20 ± 1,71 ^{cdef}	48,68 ± 1,53 ^{ab}
CR 1%	36,11 ± 2,17 ^{ij}	47,28 ± 2,49 ^{bc}	49,41 ± 0,97 ^a
HO 0,5%	19,61 ± 1,96 ^q	39,45 ± 2,72 ^h	39,60 ± 1,84 ^h
HO 1%	22,03 ± 1,38 ^{pq}	42,51 ± 0,95 ^{efg}	41,95 ± 0,80 ^{efg}
LI 0,5 %	25,24 ± 1,56 ^{no}	37,15 ± 1,33 ^{hij}	41,54 ± 1,38 ^{efgh}
LI 1 %	26,89 ± 2,87 ^{mn}	41,70 ± 3,60 ^{efgh}	46,22 ± 1,46 ^{bcde}
LO 0,5%	25,47 ± 3,39 ^{no}	29,20 ± 2,70 ^m	38,52 ± 1,17 ^{hi}
LO 1%	26,38 ± 3,46 ^{mn}	36,34 ± 3,14 ^{ij}	40,66 ± 2,40 ^{gh}
MA 0,5%	25,22 ± 3,35 ^{no}	38,40 ± 1,13 ^{hi}	41,51 ± 1,03 ^{efgh}
MA 1%	26,11 ± 2,48 ^{mn}	42,37 ± 0,71 ^{efg}	43,36 ± 1,80 ^{defg}
TA 0,5 %	24,57 ± 3,20 ^{nop}	30,02 ± 3,74 ^m	41,07 ± 3,03 ^{fgh}
TA 1 %	24,82 ± 2,45 ^{nop}	41,33 ± 0,93 ^{fgh}	43,20 ± 1,13 ^{defg}

Q – Quitosana; CR - Óleo essencial de cravo; HO - Óleo essencial de hortelã, LI – Óleo essencial de limão; LO – Óleo essencial de louro; MA – Óleo essencial de manjeriço; TA – Óleo essencial de tangerina; Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam que existe diferença significativa (p>0,05) entre os tratamentos.

Os valores de luminosidade (L*) decresceram conforme a maior concentração de quitosana, os filmes do grupo 2% Q apresentaram os menores valores de luminosidade, tendo a coloração mais escura que os filmes dos grupos 1% Q e 1,5% Q. Com a adição das duas concentrações de óleos essenciais (0,5% e 1%) ocorreu o mesmo comportamento nos três grupos de filmes (1% Q, 1,5%Q e 2% Q) evidenciando uma diminuição nos valores de luminosidade de acordo com a maior concentração de óleo essencial nos filmes adicionados de óleo de hortelã, limão, louro, manjeriço e tangerina, sendo observado um aumento da luminosidade em relação a maior concentração de óleo essencial apenas nos filmes de quitosana com óleo essencial de cravo. Em relação à luminosidade os filmes de 1% e 1,5% de quitosana (sem adição de óleos essenciais) apresentaram diferenças significativas (p<0,05) com todos os filmes do grupo 2% Q, também apresentaram significativas (p<0,05) com alguns filmes adicionados de óleos essenciais do grupo 1% Q representados pelos filmes com óleos essenciais de limão (0,5%), louro (0,5%), manjeriço (0,5%) e tangerina (0,5% e 1%) e quase todos os filmes do grupo 1,5% Q, exceto os filmes 1,5% Q – LO 0,5%, 1,5% Q – LO 1% e 1,5% Q – TA 0,5% que não apresentaram diferenças significativas (p>0,05) com os filmes de 1% e 1,5% de quitosana (sem adição de óleos essenciais).

Os parâmetros cromáticos a^* (vermelho-verde) e b^* (amarelo-azul) apresentaram comportamentos distintos. Em relação ao parâmetro cromático a^* (vermelho-verde) a concentração de quitosana influenciou os valores, pois quanto maior a concentração de quitosana maior o valor de a^* . Também foram observados valores positivos de a^* em todos os filmes que podem indicar a predominância da cor vermelha. No parâmetro b^* (amarelo-azul) foram observados altos valores que indicam a predominância da coloração amarela e estes valores aumentaram de acordo com a maior concentração de quitosana e óleos essenciais (todos os filmes apresentaram uma coloração amarelada).

Nos três grupos (1% Q, 1,5% Q e 2% Q) foi observado que a adição dos diferentes óleos essenciais e suas concentrações de (0,5% e 1%) influenciou os valores de a^* de maneira semelhante, pois os filmes adicionados de óleo essencial de hortelã, limão, louro, manjerição e tangerina apresentaram aumento nos valores de a^* conforme a maior concentração de óleo essencial e apenas os filmes com óleo essencial de cravo registraram comportamento inverso (quanto maior a concentração de óleo essencial menor o valor de a^*). No parâmetro cromático a^* os filmes de 1% e 1,5% de quitosana (sem adição de óleos essenciais) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) com o filme de 2% de quitosana (sem adição de óleo essencial) e com quase todos os filmes adicionados de óleos essenciais do grupo 2% Q, exceto os filmes de 2% Q – HO 0,5%, 2% Q – LO 0,5% e 2% Q – LO 1% que não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) com os filmes de 1% e 1,5% de quitosana (sem adição de óleos essenciais). Também apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) com os filmes de 1% Q – CR 1%, 1,5% Q – CR 0,5%, 1,5% Q – HO 1%, 1,5% Q – LI 1%, 1,5% Q – MA 1%. Além disso, também verificou-se que o filme de 1% de quitosana (sem adição de óleo essencial) apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com os filmes do grupo 1,5% Q adicionados de óleos essenciais de cravo (1%), hortelã, limão e manjerição na concentração 0,5%. E o filme de 1,5% de quitosana (sem adição de óleo essencial) também apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com o filme de 1,5% Q – LO 0,5% e quase todos os filmes adicionados de óleos essenciais do grupo 1% Q, exceto os filmes adicionados de óleo essencial de hortelã (0,5% e 1%) que não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) com o filme de 1,5% de quitosana (sem adição de óleo essencial).

Os filmes adicionados de óleos essenciais dos grupos 1% Q, 1,5% Q e 2% Q apresentaram o mesmo comportamento em relação ao parâmetro b^* , pois conforme a adição dos óleos essenciais (0,5% e 1%) ocorreu um aumento nos valores de b^* de acordo com a maior concentração de óleo essencial. Nos valores b^* o filme de 1% de quitosana (sem adição

de óleo essencial) apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com os filmes de 1,5 e 2% de quitosana (sem adição de óleos essenciais), também apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com todos os filmes adicionados de óleos essenciais do grupo 2% Q e quase todos os filmes adicionados de óleos essenciais dos grupos 1% Q e 1,5 % Q, exceto com os filmes de 1% Q – LI 1%, 1% Q – LO 1%, 1% Q – MA 1%, 1,5% Q – LO 0,5%, 1,5% Q – TA 0,5% que não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) com o filme 1% de quitosana (sem adição de óleo essencial).

Em estudo com filmes de quitosana e óleo essencial de eucalipto em diferentes concentrações (1%, 2%, 3% e 4%) Hafsa *et al.* (2016) observaram uma diminuição nos valores de luminosidade de acordo com a maior concentração de óleo essencial e uma variação considerável nos valores de a^* e b^* também conforme o aumento da concentração de óleo essencial. Em contrapartida Souza *et al.* (2017) observaram que os filmes de quitosana incorporados com óleos essenciais de alecrim, salvia, melaleuca, tomilho e gengibre apresentaram valores de luminosidade semelhantes ao filme com apenas quitosana e os valores de a^* (valores negativos) e b^* variaram conforme a incorporação de cada óleo essencial. Peng e Li (2014) trabalhando com filmes de quitosana e óleos essenciais de limão, tomilho e canela constataram que a incorporação dos óleos essenciais diminuiu a luminosidade dos filmes e também observaram uma variação nos valores de a^* e b^* conforme a incorporação dos óleos essenciais. Os filmes de quitosana incorporados com óleo essencial de *Zataria multiflora* Boiss (condimento iraniano semelhante ao tomilho) e extrato de semente de uva apresentaram menor luminosidade que o filme controle (quitosana sem adição de óleo essencial), sendo que também registraram valores de a^* maiores que o filme controle (quitosana sem adição de óleo essencial) e o comportamento inverso nos valores de b^* com menores valores que o filme controle (MORADI *et al.*, 2012).

Os valores de opacidade dos filmes de quitosna e óleos essenciais estão representados na Tabela 11 e apresentaram uma variação de 4,76 a 13,45 %.

Tabela 11 – Valores de opacidade (média \pm desvio padrão) dos filmes comestíveis de quitosana e óleos essenciais.

ÓLEO (%)	Opacidade (%)		
	1% Q	1,5% Q	2% Q
Sem óleo	5,55 \pm 1,23 ^{efghij}	6,97 \pm 1,25 ^{defg}	8,40 \pm 1,01 ^{bcd}
CR 0,5%	7,27 \pm 0,93 ^{cd}	8,99 \pm 0,82 ^{bc}	9,79 \pm 0,92 ^b
CR 1%	8,35 \pm 0,73 ^{bcd}	12,37 \pm 0,88 ^a	13,45 \pm 0,89 ^a
HO 0,5%	6,71 \pm 1,00 ^{defg}	7,02 \pm 0,57 ^{de}	7,43 \pm 0,74 ^{cde}
HO 1%	7,00 \pm 0,96 ^{de}	7,73 \pm 0,48 ^{cd}	7,94 \pm 0,91 ^{bcd}
LI 0,5 %	4,83 \pm 0,49 ^{ij}	7,30 \pm 0,66 ^{cde}	7,40 \pm 0,68 ^{cde}
LI 1 %	5,36 \pm 0,36 ^{fghij}	8,15 \pm 0,85 ^{bcd}	8,39 \pm 0,58 ^{bcd}
LO 0,5%	7,09 \pm 0,61 ^d	8,95 \pm 0,58 ^{bc}	9,65 \pm 1,55 ^b
LO 1%	7,82 \pm 0,89 ^{bcd}	12,09 \pm 1,69 ^a	12,82 \pm 3,07 ^a
MA 0,5%	4,76 \pm 1,13 ^j	7,37 \pm 0,85 ^{cde}	7,95 \pm 0,82 ^{bcd}
MA 1%	5,01 \pm 1,14 ^{ij}	7,50 \pm 0,73 ^{cd}	8,23 \pm 0,88 ^{bcd}
TA 0,5 %	5,10 \pm 1,07 ^{hij}	7,35 \pm 1,06 ^{cde}	7,63 \pm 0,52 ^{cd}
TA 1 %	5,33 \pm 1,52 ^{ghij}	7,60 \pm 0,98 ^{cd}	8,41 \pm 0,69 ^{bcd}

Q – Quitosana; CR - Óleo essencial de cravo; HO - Óleo essencial de hortelã, LI – Óleo essencial de limão; LO – Óleo essencial de louro; MA – Óleo essencial de manjeriço; TA – Óleo essencial de tangerina; Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam que existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

Os valores de opacidade observados nos grupos 1% Q, 1,5% Q e 2% Q aumentaram de acordo com a maior concentração de quitosana, sendo o menor valor encontrado no filme de 1% de quitosana com 0,5% de óleo essencial de manjeriço e os maiores valores de opacidade ficaram a cargo dos filmes de 2% de quitosana com óleos essenciais de cravo e louro na concentração de 1%, conseqüentemente estes últimos apresentaram colorações amareladas mais escuras que os demais. Os filmes dos três grupos (1% Q, 1,5% Q e 2% Q) apresentaram o mesmo comportamento em relação às concentrações de óleos essenciais (0,5% e 1%) incorporadas aos filmes, pois os valores de opacidade aumentaram de acordo com a maior concentração de óleos essenciais.

Em termos de opacidade o filme de 1% de quitosana (sem adição de óleo essencial) apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com o filme de 2% de quitosana (sem adição de óleo essencial). Com relação aos filmes adicionados de óleos essenciais, o filme de 1% de quitosana (sem adição de óleo essencial) apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com os filmes do seu grupo 1% Q adicionados de óleos essenciais de cravo e louro nas concentrações de 0,5% e 1% e também apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com quase todos os filmes adicionados de óleos essenciais dos grupos 1,5% Q e 2% Q, exceto

pelos filmes de 1,5% Q – HO 0,5%, 1,5% Q – LI 0,5%, 1,5% Q – MA 0,5%, 1,5% Q – TA 0,5%, 2% Q – HO 0,5% e 2% Q – LI 0,5% que não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) com o filme 1% de quitosana (sem adição de óleo essencial). Já o filme de 1,5% (sem adição de óleo essencial) apresentou diferenças significativas ($p<0,05$) com os filmes do grupo 1% Q adicionados de óleos essenciais de limão, manjeriço e tangerina nas concentrações de 0,5% 1% e também apresentou diferenças significativas ($p<0,05$) com os filmes dos grupos 1,5% Q e 2% Q adicionados de óleos essenciais de cravo e louro nas concentrações de 0,5% e 1%.

Os filmes de quitosana com óleo de oliva apresentaram maior opacidade que os filmes com apenas quitosana, uma vez que as gotas de óleo dispersas na matriz do carboidrato podem afetar a transparência, evitando a transmissão da luz através do filme resultante (PEREDA *et al.*, 2012). Souza *et al.* (2017) em estudo sobre filmes de quitosana com diferentes óleos essenciais observaram que os filmes de quitosana incorporados com óleos essenciais de alecrim, salvia, melaleuca e tomilho apresentaram menor opacidade que os filmes com apenas quitosana e somente o filme com óleo de gengibre apresentou o comportamento contrário com o maior valor de opacidade entre os filmes. E de acordo com Peng e Li (2014) os filmes de quitosana incorporados com óleos essenciais de limão, tomilho e canela apresentam maior opacidade que o filme controle (quitosana sem adição de óleo essencial).

2.4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo, hortelã, limão, louro, manjeriço e tangerina frente a quatro cepas bacterianas está representada na Tabela 12. Sendo possível observar a ação antimicrobiana (formação de halos de inibição) dos óleos essenciais e dos controles (ampicilina e glicerol) em relação a cada cepa bacteriana.

Tabela 12 - Atividade antimicrobiana (média \pm desvio padrão) de óleos essenciais (cravo, hortelã, limão, louro, manjeriço e tangerina) frente a quatro cepas bacterianas.

ÓLEO ESSENCIAL	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
	ATCC - 25922	ATCC - 25923	ATCC - 13076	IOC - 18950
	Diâmetro do halo (mm)			
CR	24,82 \pm 1,56	16,17 \pm 0,11	16,41 \pm 0,35	17,07 \pm 0,01
HO	18,32 \pm 0,35	16,71 \pm 1,16	12,70 \pm 0,09	48,44 \pm 2,45
LI	8,06 \pm 1,10	-	-	14,54 \pm 1,18
LO	16,71 \pm 2,41	12,64 \pm 1,97	13,32 \pm 0,35	16,36 \pm 1,69
MA	14,97 \pm 1,14	12,65 \pm 1,98	11,98 \pm 0,25	-
TA	17,64 \pm 0,14	14,36 \pm 1,44	10,49 \pm 0,20	20,24 \pm 0,32
AMP	22,65 \pm 0,93	19,73 \pm 0,40	25,28 \pm 0,29	-
GLICEROL	-	-	-	-

CR - Óleo essencial de cravo; HO - Óleo essencial de hortelã, LI - Óleo essencial de limão; LO - Óleo essencial de louro; MA - Óleo essencial de manjeriço; TA - Óleo essencial de tangerina; AMP - ampicilina; - Sem halo de inibição

Em relação à cepa de *Escherichia coli* os halos de inibição (diâmetro) apresentaram variação de 8,06 a 24,82 mm, onde todos os óleos essenciais apresentaram atividade antimicrobiana, destacando o óleo de cravo como o maior halo de inibição, superando até a ampicilina (controle positivo). Na cepa de *Staphylococcus aureus* os halos de inibição apresentaram uma variação de 12,64 a 19,73 mm, destacando a ampicilina como o maior valor e os óleos de cravo e hortelã como os valores mais elevados entre os óleos essenciais. A cepa de *Salmonella enterica* apresentou uma variação em relação aos halos de inibição de 10,49 a 25,28 mm, a ampicilina também apresentou o maior halo de inibição e o óleo de cravo o valor mais elevado entre os óleos essenciais. E a cepa de *Vibrio parahaemolyticus* apresentou a maior variação em relação ao diâmetro dos halos de inibição de 14,54 a 48,44 mm, tendo o óleo essencial de hortelã apresentado o maior halo de inibição e a ampicilina não apresentou halo de inibição. O glicerol (controle negativo) não apresentou atividade antimicrobiana (sem halo de inibição) frente às quatro cepas bacterianas (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* e *Vibrio parahaemolyticus*). Os óleos essenciais testados apresentaram considerável atividade antimicrobiana frente às cepas bacterianas testadas. Com exceção dos óleos essenciais de limão (sem halo de inibição para *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*) e manjeriço (sem halo de inibição para *Vibrio parahaemolyticus*).

Vários estudos comprovaram que os óleos essenciais (OEs) exercem atividade antimicrobiana, mas seus mecanismos de ação ainda não estão inteiramente elucidados (CALO *et al.*, 2015). De acordo com Ghabraie *et al.* (2016) a maioria dos óleos essenciais

exterminam as bactérias afetando a sua membrana celular de diversas maneiras e causando a morte celular. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode estar associada a sua composição química, pois a presença de determinados compostos pode causar alterações na permeabilidade da membrana externa dos microrganismos e/ou inibir enzimas importantes para o crescimento e sobrevivência dos mesmos (Cunha *et al.*, 2012). Em decorrência de sua característica lipofílica, os óleos essenciais podem permeabilizar as membranas de bactérias causando a perda de íons e ATP, colapso de bombas de prótons e principalmente liberação de macromoléculas que causam a lise celular das bactérias (BAKKALI *et al.*, 2008; TURGIS *et al.*, 2012).

No óleo essencial de cravo, o eugenol seu principal componente tem ação na bactéria através da destruição do mecanismo de regulação da permeabilidade seletiva da célula, provocando o rompimento da parede celular da bactéria, levando-a ao processo de morte celular (AFFONSO *et al.*, 2012). Ghabraie *et al.* (2016) em estudo com diversos óleos essenciais registraram a ação antimicrobiana de óleo essencial de cravo em cepas padrões de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium*. O óleo de cravo apresentou ação inibitória sobre cepas padrões de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* (AUAD, *et al.*, 2013). Santos *et al.* (2011) também constaram a ação antimicrobiana de óleo de cravo em cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Em estudo com óleos essenciais cítricos, Espina *et al.* (2011) encontraram amplo espectro de atividade antimicrobiana em óleo essencial de mandarina frente a cepas de bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecium*) e Gram negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*). Em contraposição ao nosso estudo Kunicka-Styczyn *et al.* (2009) constataram a ação antimicrobiana de óleo essencial de limão em cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. O óleo essencial de casca de tangerina apresenta vários componentes ativos que podem suprimir de maneira satisfatória a atividade de reações enzimáticas e microbianas (HO; KUO, 2014). Cherrat *et al.* (2014) em pesquisa sobre a atividade antimicrobiana de óleo essencial de louro constataram a ação antimicrobiana do mesmo frente a diversas cepas padrões de bactérias Gram positivas e Gram negativas, tais como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella Senftenberg*. Reddy *et al.* (2017) observaram significativa atividade antibacteriana de óleo essencial de hortelã contra cepas padrões de bactérias Gram positivas e Gram negativas, tais como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*. O óleo essencial de manjeriço apresenta ampla

atividade antimicrobiana frente a cepas padrões de varias bactérias, tais como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (HUSSAIN *et al.*, 2008).

2.4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais

Os resultados da atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais (formação de halo de inibição) estão representados nas Tabelas 13, 14, 15 e 16. Vale ressaltar que todos os revestimentos apresentaram atividade antimicrobiana frentes às quatro cepas bacterianas utilizadas e o diâmetro dos halos de inibição dos revestimentos dos grupos 1% Q, 1,5% Q e 2% Q apresentaram variação frente às quatro cepas padrões utilizadas. A cepa de *E. coli* (Tabela 13) apresentou variação de 11,31 a 15,83 mm entre os tratamentos. Em relação à cepa de *Staphylococcus aureus* (Tabela 14) ocorreu uma variação no diâmetro dos halos entre os tratamentos de 11,16 a 16,99 mm. Na cepa de *Salmonella enterica* (Tabela 15) o diâmetro dos halos de inibição apresentou uma variação de 10,91 a 15,79 mm entre os tratamentos. E de acordo com a cepa de *Vibrio parahaemolyticus* (Tabela 16) foi possível observar uma variação no diâmetro dos halos de inibição de 11,16 a 16,83 mm.

Tabela 13 - Atividade antimicrobiana (média \pm desvio padrão) dos revestimentos comestíveis frente à cepa padrão de *Escherichia coli* ATCC – 25922.

ÓLEO (%)	<i>Escherichia coli</i> ATCC - 25922		
	1% Q	1,5% Q	2% Q
Sem óleo	13,29 \pm 0,09 ^{abc}	12,33 \pm 0,73 ^{bc}	13,71 \pm 0,13 ^{abc}
CR 0,5%	14,68 \pm 0,98 ^{ab}	13,75 \pm 0,44 ^{abc}	12,26 \pm 0,23 ^{bc}
CR 1%	15,83 \pm 0,88 ^a	15,00 \pm 1,11 ^{ab}	13,07 \pm 0,01 ^{abc}
HO 0,5%	12,60 \pm 0,64 ^{bc}	13,60 \pm 0,35 ^{abc}	12,55 \pm 0,28 ^{bc}
HO 1%	12,91 \pm 0,14 ^{abc}	14,07 \pm 0,75 ^{bcd}	11,93 \pm 1,16 ^{bc}
LI 0,5 %	13,25 \pm 1,49 ^{abc}	13,69 \pm 0,91 ^{abc}	12,92 \pm 0,14 ^{abc}
LI 1 %	12,84 \pm 0,64 ^{abc}	13,52 \pm 0,65 ^{abc}	12,71 \pm 0,85 ^{abc}
LO 0,5%	13,38 \pm 0,31 ^{abc}	13,19 \pm 0,18 ^{abc}	11,86 \pm 0,27 ^{bc}
LO 1%	13,29 \pm 0,74 ^{abc}	13,03 \pm 0,47 ^{abc}	11,37 \pm 0,11 ^c
MA 0,5%	13,60 \pm 0,37 ^{abc}	13,06 \pm 0,36 ^{abc}	12,30 \pm 0,11 ^{bc}
MA 1%	13,23 \pm 2,29 ^{abc}	13,53 \pm 0,04 ^{abc}	11,31 \pm 0,51 ^c
TA 0,5 %	13,08 \pm 1,93 ^{abc}	11,93 \pm 0,23 ^{bc}	12,17 \pm 0,40 ^{bc}
TA 1 %	13,75 \pm 0,20 ^{abc}	12,58 \pm 0,64 ^{bc}	12,24 \pm 0,83 ^{bc}

Q – Quitosana; CR - Óleo essencial de cravo; HO - Óleo essencial de hortelã, LI – Óleo essencial de limão; LO – Óleo essencial de louro; MA – Óleo essencial de manjeriçao; TA – Óleo essencial de tangerina; Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam que existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 14 - Atividade antimicrobiana (média \pm desvio padrão) dos revestimentos comestíveis frente à cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC - 25923.

ÓLEO (%)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC - 25923		
	1% Q	1,5% Q	2% Q
Sem óleo	14,33 \pm 0,13 ^{abcd}	14,89 \pm 0,35 ^{abcd}	11,16 \pm 1,52 ^d
CR 0,5%	15,25 \pm 1,66 ^{abcd}	14,77 \pm 0,26 ^{abcd}	13,93 \pm 1,53 ^{abcd}
CR 1%	16,02 \pm 2,08 ^{abc}	15,05 \pm 1,34 ^{abcd}	15,96 \pm 1,48 ^{abc}
HO 0,5%	16,21 \pm 0,16 ^{abc}	15,38 \pm 1,81 ^{abcd}	11,82 \pm 1,05 ^{bcd}
HO 1%	16,99 \pm 0,18 ^a	13,57 \pm 0,07 ^{abcd}	12,71 \pm 0,21 ^{bcd}
LI 0,5 %	15,76 \pm 0,34 ^{abcd}	13,56 \pm 2,35 ^{abcd}	13,26 \pm 1,07 ^{abcd}
LI 1 %	15,30 \pm 0,74 ^{abcd}	14,47 \pm 1,77 ^{abcd}	12,65 \pm 0,32 ^{bcd}
LO 0,5%	16,27 \pm 0,83 ^{abc}	13,12 \pm 1,77 ^{abcd}	13,34 \pm 1,07 ^{abcd}
LO 1%	16,37 \pm 1,21 ^{ab}	12,49 \pm 0,42 ^{bcd}	12,77 \pm 1,08 ^{abcd}
MA 0,5%	14,97 \pm 0,78 ^{abcd}	15,01 \pm 0,76 ^{abcd}	12,95 \pm 1,10 ^{abcd}
MA 1%	15,13 \pm 0,08 ^{abcd}	14,22 \pm 0,68 ^{abcd}	12,01 \pm 0,32 ^{bcd}
TA 0,5 %	14,76 \pm 0,70 ^{abcd}	13,48 \pm 0,37 ^{abcd}	11,65 \pm 0,88 ^{cd}
TA 1 %	15,93 \pm 0,16 ^{abc}	14,04 \pm 1,42 ^{abcd}	12,17 \pm 0,44 ^{bcd}

Q – Quitosana; CR - Óleo essencial de cravo; HO - Óleo essencial de hortelã, LI – Óleo essencial de limão; LO – Óleo essencial de louro; MA – Óleo essencial de manjeriço; TA – Óleo essencial de tangerina; Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam que existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 15 - Atividade antimicrobiana (média \pm desvio padrão) dos revestimentos comestíveis frente à cepa padrão de *Salmonella enterica* ATCC - 13076.

ÓLEO (%)	<i>Salmonella enterica</i> ATCC - 13076		
	1% Q	1,5% Q	2% Q
Sem óleo	12,19 \pm 1,03 ^{abc}	12,17 \pm 0,92 ^{abc}	11,00 \pm 1,36 ^c
CR 0,5%	14,97 \pm 1,28 ^{ab}	14,30 \pm 0,18 ^{abc}	11,17 \pm 2,18 ^{bc}
CR 1%	15,70 \pm 1,05 ^a	15,79 \pm 0,18 ^a	13,40 \pm 0,37 ^{abc}
HO 0,5%	12,28 \pm 2,27 ^{abc}	11,86 \pm 0,02 ^{abc}	11,42 \pm 0,37 ^{bc}
HO 1%	12,13 \pm 1,92 ^{abc}	11,19 \pm 0,03 ^{bc}	11,33 \pm 0,78 ^{bc}
LI 0,5 %	12,57 \pm 1,38 ^{abc}	11,43 \pm 1,41 ^{bc}	10,91 \pm 0,57 ^c
LI 1 %	12,89 \pm 0,25 ^{abc}	11,81 \pm 0,29 ^{bc}	10,99 \pm 0,25 ^c
LO 0,5%	13,57 \pm 0,33 ^{abc}	13,03 \pm 0,57 ^{abc}	12,07 \pm 0,45 ^{abc}
LO 1%	14,18 \pm 0,37 ^{abc}	12,37 \pm 0,81 ^{abc}	11,20 \pm 0,85 ^{bc}
MA 0,5%	14,00 \pm 1,03 ^{abc}	13,34 \pm 0,16 ^{abc}	11,55 \pm 0,83 ^{bc}
MA 1%	14,31 \pm 0,63 ^{abc}	13,41 \pm 0,06 ^{abc}	11,70 \pm 1,10 ^{bc}
TA 0,5 %	13,00 \pm 0,37 ^{abc}	11,65 \pm 0,66 ^{bc}	11,32 \pm 1,13 ^{bc}
TA 1 %	13,48 \pm 0,34 ^{abc}	12,33 \pm 0,91 ^{abc}	11,76 \pm 1,00 ^{bc}

Q – Quitosana; CR - Óleo essencial de cravo; HO - Óleo essencial de hortelã, LI – Óleo essencial de limão; LO – Óleo essencial de louro; MA – Óleo essencial de manjeriço; TA – Óleo essencial de tangerina; Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam que existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 16 - Atividade antimicrobiana (média \pm desvio padrão) dos revestimentos comestíveis frente à cepa padrão de *Vibrio parahaemolyticus* IOC - 18950.

ÓLEO (%)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> IOC - 18950		
	1% Q	1,5% Q	2% Q
Sem óleo	12,01 \pm 0,33 ^{fghij}	12,57 \pm 0,40 ^{defghij}	11,89 \pm 0,98 ^{ghij}
CR 0,5%	15,17 \pm 0,62 ^{abc}	14,21 \pm 0,48 ^{bcde}	14,11 \pm 0,72 ^{bcde}
CR 1%	16,83 \pm 0,44 ^a	15,88 \pm 1,24 ^{ab}	15,83 \pm 0,08 ^{ab}
HO 0,5%	13,28 \pm 0,30 ^{cdefghi}	12,48 \pm 0,63 ^{defghij}	11,16 \pm 0,91 ^j
HO 1%	13,56 \pm 0,11 ^{cdefgh}	14,00 \pm 0,61 ^{bcdef}	11,68 \pm 0,12 ^{hij}
LI 0,5 %	13,21 \pm 0,71 ^{cdefghij}	13,17 \pm 0,33 ^{cdefghij}	11,69 \pm 0,30 ^{hij}
LI 1 %	13,44 \pm 0,40 ^{cdefghi}	13,28 \pm 0,20 ^{cdefghi}	11,72 \pm 0,06 ^{hij}
LO 0,5%	14,40 \pm 0,45 ^{bcd}	12,27 \pm 0,44 ^{efghij}	12,47 \pm 0,35 ^{defghij}
LO 1%	14,00 \pm 0,52 ^{bcdef}	12,07 \pm 0,48 ^{fghij}	11,70 \pm 0,42 ^{hij}
MA 0,5%	13,01 \pm 0,04 ^{defghij}	12,11 \pm 0,16 ^{efghij}	11,38 \pm 0,60 ^{ij}
MA 1%	13,11 \pm 0,16 ^{cdefghij}	12,38 \pm 0,88 ^{defghij}	12,24 \pm 0,25 ^{efghij}
TA 0,5 %	13,02 \pm 0,32 ^{defghi}	12,14 \pm 0,36 ^{efghij}	11,97 \pm 0,63 ^{fghij}
TA 1 %	13,93 \pm 0,09 ^{bcdefg}	13,51 \pm 0,52 ^{cdefgh}	11,80 \pm 0,32 ^{hij}

Q – Quitosana; CR - Oléo essencial de cravo; HO - Óleo essencial de hortelã, LI – Óleo essencial de limão; LO – Óleo essencial de louro; MA – Óleo essencial de manjeriço; TA – Óleo essencial de tangerina; Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam que existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

Os revestimentos comestíveis de 1%, 1,5% e 2% de quitosana (sem adição de óleos essenciais) apresentaram um comportamento diverso em relação aos diâmetros dos halos de acordo com cepa bacteriana utilizada (FIGURA 10). Conforme a cepa de *E. coli* os revestimentos de quitosana (sem adição de óleos essenciais) apresentaram um comportamento distinto, a concentração de 1% de quitosana apresentou maior valor que a concentração de 1,5% de quitosana e a concentração de 2% de quitosana apresentou o maior valor em relação as outras concentrações de revestimentos. Em relação à cepa de *S. aureus* foi possível observar que os revestimentos de 1% 1,5% e 2% de quitosana (sem adição de óleos essenciais) apresentaram comportamento distinto, pois ocorreu um aumento no diâmetro dos halos de inibição de acordo com a maior concentração de quitosana nas concentrações 1% e 1,5% e uma progressiva diminuição no diâmetro do halo na concentração de 2% que apresentou menor valor que as demais concentrações.

Figura 10 - Resultados da atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis de quitosana frente a quatro cepas padrão bacterianas.



Fonte: Própria do autor (2017).

Nos revestimentos de 1% 1,5% e 2% de quitosana (sem adição de óleos essenciais) foi observada uma diminuição no diâmetro dos halos de inibição na cepa de *Salmonella enterica* de acordo com a maior concentração de quitosana. Na cepa de *V. parahaemolyticus* os revestimentos de 1% 1,5% e 2% de quitosana (sem adição de óleos essenciais) também apresentaram comportamento distinto, nas concentrações 1% para 1,5% foi observado um acréscimo nos diâmetros dos halos inibição e um decréscimo no revestimento de 2% de quitosana que apresentou o menor halo de inibição entre os tratamentos com quitosana (sem adição de óleos essenciais).

De maneira geral os revestimentos de quitosana e óleos essenciais apresentaram uma diminuição dos diâmetros dos halos de inibição de acordo com a maior concentração de quitosana. Mas também foi possível observar um comportamento distinto da atividade antimicrobiana (diâmetro dos halos de inibição) dos revestimentos comestíveis de quitosana elaborados com diferentes óleos essenciais (cravo, hortelã, limão, louro, manjerição e tangerina) e duas concentrações (0,5 e 1%) frente às quatro cepas bacterianas. Sendo o revestimento de 1% de quitosana incorporado com 1% de óleo essencial de cravo a apresentar o maior halo de inibição frente as cepas de bactérias Gram negativas *Escherichia coli* e *Vibrio parahaemolyticus*. O revestimento de 1,5% de quitosana incorporado com 1% de óleo essencial de cravo apresentou o maior halo de inibição frente a cepa de *Salmonella enterica* (bactéria Gram negativa). E o revestimento de 1% de quitosana incorporado com 1% de óleo essencial de hortelã apresentou o maior halo de inibição frente a bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus* (melhor ação antimicrobiana do estudo).

O comportamento (diâmetro dos halos de inibição) dos revestimentos dos grupos 1% Q, 1,5% Q e 2% Q adicionados de óleos essenciais nas concentrações de 0,5% e 1% frente à cepa de *E. coli* pode ser observado na Figura 11. Observou-se um aumento no

diâmetro dos halos em relação a maior concentração de óleo essencial nos revestimentos com óleo de cravo e tangerina.

Figura 11 - Resultados da atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis de quitosana com óleos essenciais frente à cepa de *E. coli*.



Fonte: Própria do autor (2017).

Os revestimentos com óleos essenciais de limão e louro apresentaram comportamento inverso, ou seja, com o aumento da concentração de óleo essencial ocorreu um decréscimo no diâmetro dos halos de inibição de *E. coli*. E os revestimentos com os óleos essenciais de hortelã e manjericao apresentaram comportamento distinto, o primeiro (revestimento com óleo essencial de hortelã) apresentou aumento no diâmetro dos halos de inibição de *E. coli* em relação a maior concentração de óleo nos revestimentos de 1% e 1,5% de quitosana e diminuição do diâmetro dos halos em relação a maior concentração de óleo nos revestimentos de 2% de quitosana e o segundo (revestimento com óleo essencial de manjericao) apresentou decréscimo no diâmetro dos halos de inibição conforme a maior concentração de óleo nos revestimentos de 1% e 2% de quitosana e acréscimo no diâmetro dos halos de acordo com a maior concentração de óleo nos revestimentos de 1,5% de quitosana. Os diâmetros dos halos de inibição de *E. coli* dos revestimentos de 1%, 1,5% e 2% de quitosana (sem adição de óleos essenciais) não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre si. Mas o revestimento de 1,5% de quitosana (sem adição de óleo essencial) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) com o revestimento de 1% de quitosana com 1% de óleo essencial de cravo.

Na Figura 12 observa-se o comportamento dos revestimentos dos grupos 1% Q, 1,5% Q e 2% Q adicionados de óleos essenciais (0,5% e 1%) frente a cepa padrão de *S. aureus*.

Figura 12 - Resultados da atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis de quitosana com óleos essenciais frente à cepa de *S. aureus*.



Fonte: Própria do autor (2017).

Os revestimentos com óleo de cravo e tangerina apresentaram aumento dos halos de inibição de *S. aureus* conforme a maior concentração de óleo essencial. Nos revestimentos com óleo de hortelã verificou-se um comportamento distinto, evidenciando o aumento dos diâmetros dos halos de inibição de *S. aureus* em relação a maior concentração de óleo essencial nos revestimentos com 1% e 2% de quitosana e a diminuição do diâmetro dos halos em relação a maior concentração de óleo essencial nos revestimentos com 1,5% de quitosana. Com os revestimentos com óleo essencial de limão observou-se um decréscimo nos diâmetros dos halos de inibição de *S. aureus* em relação a maior concentração de óleo nas concentrações 1% e 2% de quitosana e aumento do diâmetro dos halos em relação a maior concentração de óleo nos revestimentos de 1,5 % de quitosana. E nos revestimentos com óleo de louro e manjerição foi possível observar um aumento nos diâmetros dos halos de inibição de *S. aureus* em relação a maior concentração de óleo essencial nos revestimentos de 1% de quitosana e um decréscimo do diâmetro dos halos de inibição em relação a maior concentração de óleo essencial nos revestimentos de 1,5% e 2% de quitosana.

Conforme os diâmetros dos halos de inibição de *S. aureus* foi observado que o revestimento de 1% de quitosana (sem adição de óleo essencial) não apresentou diferenças significativas ($p>0,05$) com os revestimentos de 1,5% e 2% de quitosana (sem adição de óleos essenciais). Mas o revestimento de 2% de quitosana (sem adição de óleo essencial) apresentou diferenças significativas ($p<0,05$) nos diâmetros dos halos de inibição de *S.aureus* com o revestimento 2% Q – CR 1% e alguns revestimentos do grupo 1 % Q representados pelos revestimentos com óleos essenciais de cravo (1%), hortelã (0,5% e 1%), louro (0,5% e 1%) e tangerina (1%).

O desempenho de inibição dos revestimentos dos grupos 1% Q, 1,5% Q e 2% Q adicionados de óleos essenciais nas concentrações 0,5% e 1% frente à cepa padrão de *Salmonella enterica* pode ser observado na Figura 13. O diâmetro dos halos de inibição dos revestimentos com óleo essencial de cravo, limão, manjeriçã e tangerina (grupos 1% Q, 1,5% Q e 2% Q) apresentou aumento no diâmetro dos halos de acordo com a maior concentração de óleo essencial. Os revestimentos com óleo essencial de hortelã dos grupos 1% Q, 1,5% Q e 2% Q apresentaram diminuição nos diâmetros dos halos de inibição em relação a maior concentração de óleo essencial.

Figura 13 - Resultados da atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis de quitosana com óleos essenciais frente à cepa de *Salmonella enterica*.



Fonte: Própria do autor (2017).

Com os revestimentos adicionados de óleo essencial de louro foi possível observar um decréscimo nos diâmetros dos halos de inibição de *Salmonella enterica* em relação a maior concentração de óleo essencial nos revestimentos de 1,5% e 2% de quitosana e aumento do diâmetro dos halos em relação a maior concentração de óleo essencial nos revestimentos de 1 % de quitosana.

Os revestimentos de 1%, 1,5% e 2% de quitosana (sem adição de óleos essenciais) não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) no diâmetro dos halos de inibição de *Salmonella enterica* entre si. Mas o revestimento de 2% de quitosana (sem adição de óleo essencial) apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com o revestimento de 1,5% de quitosana com 1% de óleo essencial de cravo e também com os revestimentos de 1% de quitosana adicionados de óleo essencial de cravo (0,5% e 1%).

A Figura 14 representa o comportamento dos halos de inibição dos revestimentos dos grupos 1% Q, 1,5% Q e 2% Q adicionados de óleos essenciais nas concentrações de 0,5% e 1% frente à cepa padrão de *Vibrio parahaemolyticus*. Foi observado que os revestimentos com óleo essencial de cravo, hortelã, limão e manjeriço (grupos 1% Q, 1,5% Q e 2% Q) apresentaram aumento no diâmetro dos halos de inibição conforme a maior concentração de óleo essencial.

Figura 14 - Resultados da atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis de quitosana com óleos essenciais frente à cepa de *V. parahaemolyticus*.



Fonte: Própria do autor (2017).

Os revestimentos com óleo essencial de louro (grupos 1% Q, 1,5% Q e 2% Q) apresentaram diminuição nos diâmetros dos halos de inibição de *Vibrio parahaemolyticus* em relação a maior concentração de óleo essencial. E os revestimentos com óleo essencial de tangerina apresentaram aumento nos diâmetros dos halos de inibição em relação a maior concentração de óleo essencial nos revestimentos de 1% e 1,5% de quitosana e decrescimento no diâmetro dos halos de inibição em relação a maior concentração de óleo essencial nos revestimentos de 2 % de quitosana.

Pelos diâmetros dos halos de inibição de *Vibrio parahaemolyticus* observou-se que os revestimentos de 1%, 1,5% e 2% de quitosana (sem adição de óleos essenciais) não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre si, mas os revestimentos de 1% e 2% de quitosana (sem adição de óleo essencial) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) com todos os revestimentos adicionados de óleo essencial de cravo (1% Q – CR 0,5%, 1% Q – CR 1%, 1,5% Q – CR 0,5%, 1,5% Q – CR 1%, 2% Q – CR 0,5%, 2% Q - CR 1%) e louro (0,5%). O revestimento de 1,5% de quitosana (sem adição de óleo essencial) apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com os revestimentos adicionados de óleo essencial de cravo (1% Q – CR 0,5%, 1% Q - CR 1%, 1,5% Q – CR 1%, 2% Q – CR 1%). E o revestimento de 2% de quitosana (sem adição de óleo essencial) também apresentou diferenças significativas com os revestimentos de 1% de quitosana com óleo essencial de hortelã (1%) e louro (1%).

O pH tem comprovado efeito na atividade antimicrobiana da quitosana, sendo maior em pH baixo, fato este que pode ser explicado pela ionização dos grupos amino da quitosana em pH abaixo de 6 (DEVLIEGHERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004). O peso molecular pode interferir no modo de ação da quitosana, visto que a quitosana de baixo peso molecular tem a capacidade de adentrar nas células e se ligar ao DNA microbiano inibindo a transcrição e tradução e a quitosana de alto peso molecular tem ação quelante, com ligação a metais traços que são fundamentais na produção de toxinas e no crescimento de micro-organismos (SÃO PEDRO *et al.*, 2009). Tem como característica marcante o efeito de amplo espectro contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, bem como fungos (KONG *et al.*, 2010). Podendo exibir efeitos bactericidas mais potentes nas bactérias Gram positivas do que nas Gram negativas (FERNANDEZ-SAIZ; LAGARON; OCIO, 2009).

Em termos de quitosana podemos destacar em nosso estudo o alto grau de desacetilação da quitosana (95,1%), alto peso molecular da quitosana, baixo pH dos revestimentos (todos com pH menor que 5) e o tipo de micro-organismo, pois apesar de todos

os revestimentos apresentarem atividade antimicrobiana observamos em termos gerais uma melhor ação antimicrobiana (maiores halos de inibição) frente a bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus*, provavelmente devido a sua parede composta por mais grossa camada de peptidoglicano e também por causa dos ácidos teicoicos carregados de grupos fosfatos com carga negativa que estabelecem interações eletrostáticas com os compostos catiônicos da quitosana.

Na produção de filmes e revestimentos a utilização da quitosana tem sido amplamente estudada, devido à sua atividade antimicrobiana comprovada pela eficácia em inibir o crescimento de bactérias Gram positivas e Gram negativas (SIRIPATRAWAN; HARTE, 2010). No *et al.* (2002) em estudo com filme de 1% de quitosana comprovaram a atividade antimicrobiana do polímero frente a bactérias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus* e Gram positivas como *Staphylococcus aureus*. Arancibia *et al.* (2014a) em pesquisa com soluções filmogênicas de 2% de quitosana também constataram a atividade antimicrobiana do polímero frente a micro-organismos Gram positivos como *Staphylococcus aureus* e Gram negativos como *Salmonella cholerasuis* e *Vibrio parahaemolyticus* e ainda ressaltaram que sua ação antimicrobiana foi afetada pelo pH da solução, bem como pelo tipo de micro-organismo.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais não está completamente esclarecida, diversas vertentes foram sugeridas para aclarar os mecanismos de sua atividade antimicrobiana, como a separação da camada lipídica na membrana celular, que pode causar perturbação nos sistemas enzimáticos, comprometendo o material genético das bactérias e formando hidroperoxidase de ácidos graxos causada pela oxigenação dos ácidos graxos insaturados (ATARÉS; CHIRALT, 2016). A natureza hidrofóbica dos seus componentes pode estar associada à sua atividade antimicrobiana, podendo levar a degradação das membranas das bactérias (DUSAN *et al.*, 2006). A composição química dos óleos essenciais pode estar relacionada à sua ação antimicrobiana, pois os mesmos são constituídos por diferentes combinações de compostos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, e derivados oxigenados. Em óleo essencial de cravo, o engenol, que representa seu principal composto pode ser apontado como o principal responsável pela sua atividade antimicrobiana (AFFONSO *et al.*, 2012). Nos óleos essenciais cítricos (limão e tangerina) o limoneno e o citruleno são os compostos mais comumente encontrados, podendo exercer atividade antimicrobiana de amplo espectro (Calo *et al.*, 2015). Mas Espina *et al.* (2011) observaram uma diferenciada atividade antimicrobiana em três óleos essenciais cítricos (laranja, limão e

mandarina) com altas concentrações de limoneno (59 a 85%), sendo o óleo de mandarina (*Citrus reticulata*), o único a exercer atividade antimicrobiana sobre a maioria das cepas bacterianas analisadas, assim a atividade antimicrobiana dos óleos em questão poderia ser atribuída a presença de outros constituintes encontrados em menores quantidades como os monoterpenos oxigenados. Segundo Merghni *et al.* (2016) a ação antimicrobiana do óleo essencial de louro (*Laurus nobilis*) pode ser atribuída aos compostos majoritários 1,8-cineol, metil-eugenol, α -terpenil acetato e linalol. No óleo essencial de manjeriço (*O. Basilicum*) sua atividade antimicrobiana pode ser atribuída ao alto teor de linalol presente em sua composição (KOUTSOUDAKI; KRSEK; RODGER, 2005; SARTORATOTTO *et al.*, 2004; SOKOVIC; VAN GRIENSVEN, 2006; SUPPAKUL *et al.*, 2003b). Iscan *et al.* (2002) avaliando a ação antimicrobiana do óleo essencial de hortelã demonstraram que os compostos mentol e mentona (componentes majoritários) podem ser os responsáveis por sua ação antimicrobiana.

Em geral a incorporação dos óleos essenciais em filmes e revestimentos de quitosana confirma ou aprimora a eficiência antibacteriana da quitosana contra diferentes micro-organismos deteriorantes e patogênicos, mas a composição, a estrutura, assim como os grupos funcionais dos óleos essenciais desempenham um papel primordial na determinação da sua atividade antimicrobiana, portanto a atividade antibacteriana de filmes e revestimentos à base de quitosana e óleos essenciais depende da natureza dos óleos essenciais (YUAN; CHEN; LI, 2016). A incorporação de alguns óleos essenciais pode ter intensificado a atividade antimicrobiana dos revestimentos avaliados, pois os revestimentos com óleos essenciais de hortelã, cravo, louro e tangerina apresentaram os maiores halos de inibição do estudo.

Em estudo com filmes de 1% de quitosana com diferentes concentrações de óleos essenciais (0,5%, 1% e 1,5%) frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enteritidis* foi comprovado que os filmes de quitosana incorporados com óleo essencial de tomilho apresentaram melhor atividade antibacteriana (maiores halos de inibição) que os filmes incorporados com óleos essenciais de cravo e canela em todas as concentrações de óleo utilizadas (HOSSEINI *et al.*, 2009). Wang *et al.* 2011 trabalhando com filmes de 2% de quitosana incorporados com óleos essenciais de cravo, canela e anis estrelado observaram que os filmes incorporados com óleo essencial de cravo apresentaram a melhor atividade antimicrobiana em teste com os micro-organismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os filmes de 2% quitosana incorporados com diferentes concentrações de óleo essencial de

eucalipto (1%, 2%, 3%, 4%) apresentaram promissora atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em todas as concentrações de óleo essencial (HAFSA *et al.*, 2016).

2.5 Conclusões

Os revestimentos de quitosana e óleos essenciais dos grupos 1% Q, 1,5% Q e 2% Q apresentaram aumento nos valores de pH de acordo com a maior concentração de quitosana.

A solubilidade dos filmes foi influenciada pela concentração de quitosana e óleo essencial, os filmes de 1,5% de quitosana com óleo essencial de cravo e louro apresentaram os mais elevados valores de solubilidade e o filme de 1% de quitosana (sem adição de óleo essencial) a mais baixa solubilidade e devido a sua baixa solubilidade em água pode ser indicado para alimentos com alta umidade como o pescado. A permeabilidade ao vapor de água (PVA) e a espessura apresentaram relação direta com a concentração de quitosana, ou seja, os filmes com maior concentração de quitosana apresentaram maiores valores de permeabilidade ao vapor de água e espessura.

As propriedades mecânicas dos filmes sofreram influência da concentração de quitosana, os filmes de 1% de quitosana apresentaram a maior fragilidade (película muito fina e bastante susceptível a quebra); os filmes de 1,5% de quitosana apresentaram os melhores resultados em termos de flexibilidade (menos susceptível a quebra que os filmes de 1%) e os filmes 2% apresentaram maior rigidez de material.

Em termos de cor e opacidade, os filmes de quitosana e óleos essenciais tiveram relação direta com a concentração de quitosana. Todos os filmes apresentaram uma coloração amarelada (intensificada de acordo com a maior concentração de quitosana). A opacidade apresentou comportamento diretamente proporcional a maior concentração de quitosana (maiores valores de opacidade nos filmes de 2% de quitosana com cravo e louro).

Todos os revestimentos apresentaram atividade antimicrobiana (formação de halo de inibição) frente às quatro cepas bacterianas utilizadas (*E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* e *Vibrio parahaemolyticus*). Em destaque os revestimentos de quitosana com óleos essenciais de cravo, hortelã, louro e tangerina que apresentaram os maiores halos de inibição. Em geral os revestimentos de quitosana e óleos essenciais (grupos 1% Q, 1,5% Q e 2% Q) apresentaram uma diminuição dos diâmetros dos halos de inibição de acordo com a maior concentração de quitosana frente às quatro cepas bacterianas.

3 REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS DE QUITOSANA E ÓLEOS ESSENCIAIS PARA CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* CONGELADO

RESUMO

O camarão *Litopenaeus vannamei* é uma espécie de grande potencial no mercado mundial, destacando-se pela excelente qualidade da carne, textura, sabor e aroma. Revestimentos comestíveis podem ser utilizados para prolongar a vida útil e manter a qualidade de alimentos congelados. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de revestimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais na qualidade de camarão (*L. vannamei*) congelado, através de análises químicas, físico-químicas e microbiológicas. As amostras de camarão foram divididas em cinco tratamentos: C - controle, G - glaciamento, Q - revestimento de 1,5% de quitosana, QT - revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de tangerina, QL - revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de limão. As análises de composição química, pH, bases voláteis totais (BVT), Trimetilamina (TMA), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e microbiológicas (contagem total de mesófilas e psicrotróficas, *Vibrio* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes) foram realizadas durante 180 dias de armazenamento. As taxas de absorção (revestimentos e glaciamento), perda de peso (controle), perda de revestimento e perda de glaciamento apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os meses e tratamentos. Na composição química foi observado um decréscimo nos valores de umidade, proteínas e carboidratos entre o início e o final da estocagem e com as cinzas e os lipídios foi observado o comportamento inverso. Os valores de pH, BVT e TMA mantiveram-se dentro dos limites da legislação vigente e apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Os valores de TBARS apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos. As bactérias mesófilas e psicrotróficas apresentaram redução nas contagens bacterianas ao final do período de estocagem. Em relação à *Vibrio* spp. todos os tratamentos apresentaram valores dentro da legislação vigente. E *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes os tratamentos C e G apresentaram valores acima do permitido pela legislação vigente. Os revestimentos a base de quitosana e óleos essenciais demonstraram um potencial promissor para prolongar a vida útil e manter a qualidade de camarão *L. vannamei* congelado.

Palavras-chave: Biopolímero. Compostos voláteis. Frescor. Vida útil.

ABSTRACT

Litopenaeus vannamei is a species of shrimp of great potential in the world market, standing out for its excellent quality meat, texture, flavor and smell. Edible coatings can be used to extend shelf life and keep quality of frozen food. The aim of this study was to evaluate the efficiency of chitosan edible coatings and essential oils in the quality of frozen shrimp (*L. vannamei*) through chemical, physical-chemical and microbiological analyzes. The samples were divided into five treatments: C - control, G - glazing, Q - 1.5% chitosan coating, QT - 1.5% chitosan coating + 0.5% essential oil of tangerine, QL - 1.5% chitosan coating + 0.5% essential oil of lemon. The analyzes of chemical composition, pH, total volatile basic (TVB), trimethylamine (TMA), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and microbiological (mesophilic and psychrotrophic counts, *Vibrio* spp., coagulase positive *Staphylococcus* and thermotolerant coliforms) analyzes were performed for 180 days of storage. The absorption rates (coatings and glazing), weight loss (control), loss of coating and loss of glazing presented significant differences ($p < 0.05$) between months and treatments. In the chemical composition a decrease in the values of moisture, proteins and carbohydrates was observed between the beginning and the end of the storage and on the other hand the for ashes and the lipids contents a reverse behavior was observed. The pH, TVB and TMA values remained within the limits of the current legislation and presented significant differences ($p < 0.05$) among the treatments. The TBARS values presented significant differences ($p < 0.05$) among the treatments. The mesophilic and psychrotrophic bacteria presented a reduction in bacterial counts at the end of the storage period. Regarding to *Vibrio* spp. all treatments presented values within the current legislation. For coagulase positive *Staphylococcus* and thermotolerant coliforms the C and G treatments presented values above that allowed by current legislation. The coatings based on chitosan and essential oils have demonstrated promising potential to extend shelf life and keep the quality of frozen shrimps *L. vannamei*.

Keywords: Biopolymer. Volatile compounds. Freshness. Shelf life.

3.1 Introdução

O pescado é um componente extremamente importante na dieta humana, como fonte de nutrientes (proteínas, lipídios e componentes bioativos) e dessa forma a indústria pesqueira contribui para o fornecimento de uma variedade de produtos e subprodutos para o consumo (GONÇALVES, 2011).

A crescente demanda por proteínas animais, devido ao crescimento da população mundial e da economia dos países em desenvolvimento esta na ordem do dia. Em 2014 a produção mundial de pescado proveniente da aquicultura alcançou o patamar de 73,8 milhões de toneladas e os crustáceos contribuíram com 6,91 milhões de toneladas (FAO, 2016).

O camarão marinho *Litopenaeus vannamei* é atualmente a principal espécie de crustáceo cultivada no Brasil devido às suas excelentes condições de crescimento e adaptabilidade, fácil nutrição, manejo e altos níveis de produtividade e lucratividade (BARBIERI JUNIOR; OSTRENSKY NETO, 2002; PEREZ-VELAZQUEZ *et al.*, 2012). A espécie *L. vannamei* destaca-se pelo alto valor comercial e principalmente pela excelente qualidade da carne que é rica em nutrientes essenciais para a dieta humana (DAMASCENO, 2017; YUAN; LV; TANG; ZHANG; SUN, 2016).

No entanto, os camarões são altamente perecíveis, sendo facilmente suscetíveis de contaminação devido a sua musculatura ser constituída de tecido conjuntivo frágil, pelo pH próximo da neutralidade, pela elevada atividade de água e ainda devido aos aminoácidos livres, gorduras insaturadas passíveis de oxidação e atividade enzimática autolítica (LIRA *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2015). Em virtude dessa alta perecibilidade os camarões frescos devem ser processados para estender sua vida útil, sendo o congelamento um dos métodos mais regularmente utilizados para o prolongamento de seu prazo de validade (WU, 2014). Atualmente o uso de embalagens comestíveis de biopolímeros pode ser uma alternativa excelente para estender a vida útil de pescado em geral.

A comunidade científica tem demonstrado constante interesse na utilização de polímeros biodegradáveis para a produção de embalagens comestíveis que possam substituir as embalagens plásticas convencionais. Os revestimentos comestíveis podem conservar a qualidade dos alimentos, retardando a oxidação lipídica, inibindo o crescimento microbiano, reduzindo a deterioração sensorial e a perda de umidade (JEON *et al.*, 2002; LU *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2000). Filmes e revestimentos comestíveis de polissacarídeos, proteínas e lipídios

podem prolongar a vida útil dos alimentos, pois atuam como barreira contra a umidade, oxigênio, dióxido de carbono e vapor de água (OJAGH *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2000).

A quitosana é um polissacarídeo obtido pela desacetilação da quitina, que é o principal componente dos exoesqueletos de crustáceos (PEREDA *et al.*, 2012). Pode produzir filmes com capacidade aceitável para gases (CO₂ e O₂) e propriedades funcionais para aplicação em embalagens de alimentos (LACETA *et al.*, 2013). Os filmes e revestimentos comestíveis de quitosana podem representar uma grande promessa na preservação de alimentos (KERCH, 2015). Além disso, existe um grande interesse em desenvolver materiais com natureza antimicrobiana para evitar a deterioração dos alimentos causada pela contaminação microbiana e, nesse contexto, a quitosana é um material relevante para a produção de filmes e revestimentos devido a sua potencial atividade antimicrobiana (DUTTA; TRIPATHI; MEHROTRA; DUTTA, 2009).

Sabe-se que os óleos essenciais extraídos de plantas e especiarias são excelentes antioxidantes e antimicrobianos (CARVALHO *et al.*, 2016). Os óleos essenciais podem ser incorporados em filmes e revestimentos comestíveis de biopolímeros como agentes antimicrobianos naturais e antioxidantes, com o intuito de prolongar a vida útil de alimentos perecíveis como o pescado fresco (ALPARSLAN *et al.*, 2016; OJAGH *et al.*, 2010). A incorporação de óleos essenciais em revestimentos comestíveis à base de quitosana ganhou interesse científico devido às propriedades bactericidas e fungicidas vinculadas a esses compostos voláteis (MAQBOOL; ALI; ALDERSON, 2010). Devido aos seus componentes ativos é possível potencializar consideravelmente a eficiência antibacteriana dos revestimentos de quitosana (YUAN; CHEN; LI, 2016). Óleos essenciais cítricos apresentam considerável atividade antimicrobiana e o seu efeito antimicrobiano pode ser acentuado ao serem incorporados a filmes biodegradáveis de quitosana (RANDAZZO, *et al.*, 2016).

A partir deste contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar a eficiência de revestimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais cítricos (limão e tangerina) na qualidade do camarão (*Litopenaeus vannamei*) congelado, por meio de análises químicas, físico-químicas e microbiológicas.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia de revestimentos comestíveis, à base de quitosana e óleos essenciais cítricos (limão e tangerina) na qualidade do camarão *Litopenaeus vannamei* congelado.

3.2.2 Objetivos específicos

- Analisar a influência dos revestimentos de quitosana e óleos essenciais, em relação às características químicas, físico-químicas e microbiológicas de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado;
- Determinar a vida de prateleira de camarão *Litopenaeus vanammei*, revestido e congelado, durante estocagem congelada.

3.3 Material e métodos

3.3.1 Preparação dos revestimentos e glaciamento

Os revestimentos de 1,5% de quitosana, 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de tangerina e 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de limão foram preparados no Laboratório de Tecnologia do Pescado (LATEPE), da Universidade Federal do Ceará, de acordo com SOUZA *et al.* (2010a), com adaptações. A quitosana de alto peso molecular com 95,1% de descetilação foi proveniente da Polymar Indústria e Comércio Ltda. Os revestimentos de 1,5% de quitosana (p/v) foram solubilizados em solução de ácido láctico a 1% (v/v) sob agitação com auxílio de agitador magnético (Fisaton modelo 752) durante 3 horas, em temperatura ambiente e o glicerol 0,5% (v/v) foi utilizado como plastificante. Logo após foi incorporado separadamente os óleos essenciais de tangerina e limão (Bioessência) na concentração de 0,5% (v/v), também sob agitação por 30 minutos. Após a solubilização, os revestimentos foram acondicionados em capela de fluxo laminar (Pachane modelo Pa40) e submetidos à esterilização em luz ultravioleta por 30 minutos. Em seguida foram armazenados sob refrigeração a 2°C por 24 h. Foi utilizada para o glaciamento água destilada estéril (autoclavação 121° C / 15 minutos) e armazenada sob refrigeração a 2°C por 24 h.

3.3.2 Matéria-prima

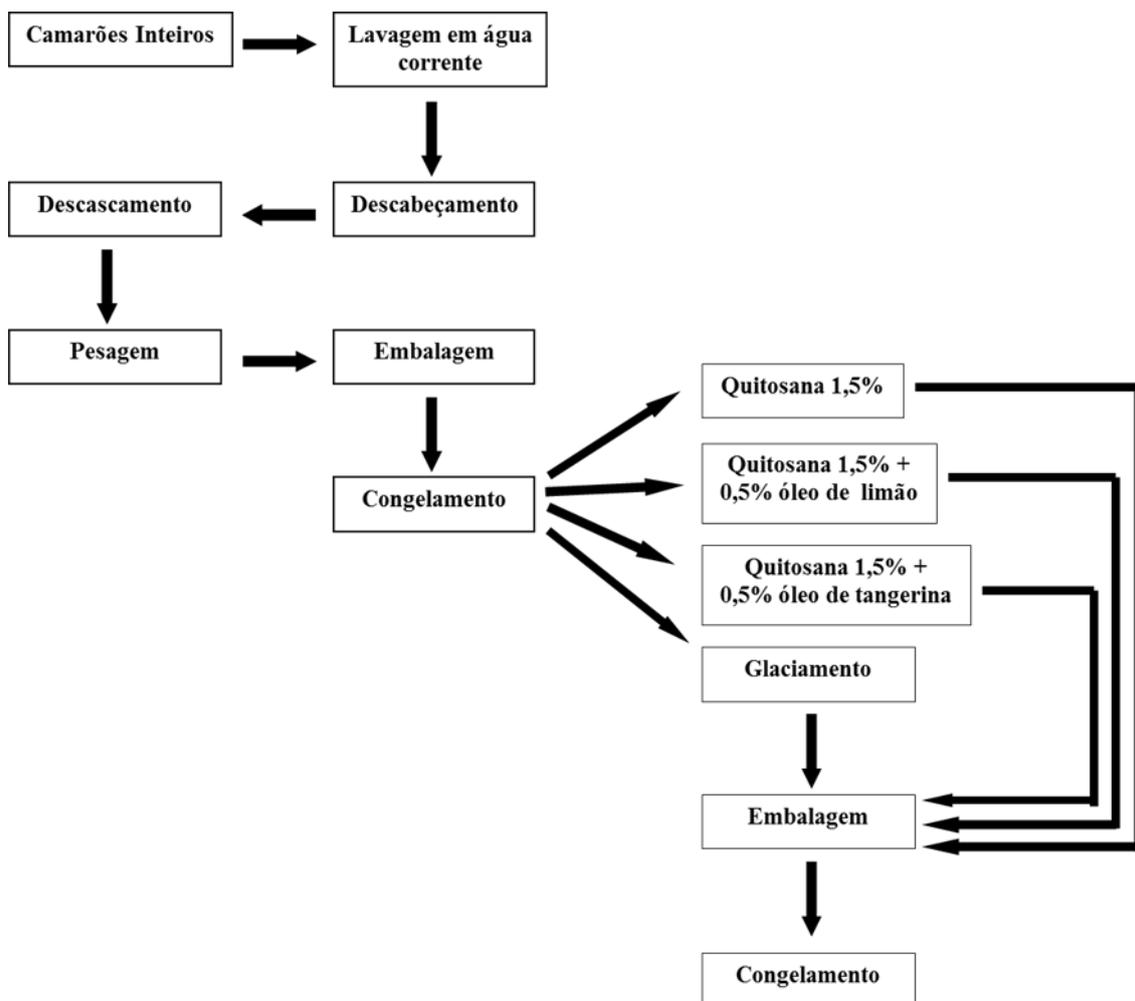
Foram adquiridos aproximadamente 15 kg de camarões cinza (*L. vanammei*) provenientes de fazenda de carcinicultura, localizada em Jaguaruana – CE; os mesmos foram acondicionados em caixa isotérmica com gelo e transportados ao Laboratório de Tecnologia do Pescado - LATEPE do Departamento de Engenharia de Pesca (DEP) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Logo após a chegada ao laboratório os camarões inteiros foram lavados em água corrente e submetidos ao processamento (descabeçamento e descascamento) de acordo com a Figura 15. Em seguida foi realizada a pesagem, embalagem e congelamento. Após 24 horas foram aplicados os revestimentos, glaciamento em água destilada estéril gelada, embalagem e congelamento novamente, em condições assépticas no salão de beneficiamento do referido laboratório, todo o processo está esquematizado na Figura 16. Os exemplares de camarões (sem cabeça e descascados) foram acondicionados em bandejas de isopor com aproximadamente 70 g de amostra em cada bandeja (FIGURA 17), totalizando 90 bandejas, sendo cada bandeja identificada e envolvida em filme de PVC para serem submetidas ao congelamento a $\pm -18^\circ$ C.

Figura 15 – Processamento dos camarões *Litopenaeus vanammei* em laboratório.



Fonte: Própria do autor (2016).

Figura 16 - Fluxograma do processamento de camarão *Litopenaeus vanammei* em laboratório.



Fonte: Própria do autor (2018).

Figura 17 – Acondicionamento das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* em bandejas de isopor.



Fonte: Própria do autor (2016).

3.3.3 Tratamentos utilizados nas amostras de camarão

As amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* (sem cabeça e descascado) foram submetidas a 5 tratamentos conforme o Quadro 3. Todas as amostras foram conservadas sob congelamento a $\pm -18^{\circ}\text{C}$ por 180 dias.

Quadro 3 – Tratamentos utilizados nas amostras de camarão *Litopenaeus vanammei*.

Tratamentos	C	G	Q	QT	QL
Controle	X	-	-	-	-
Glaciamento	-	X	-	-	-
Quitosana 1,5%	-	-	X	X	X
Óleo de Tangerina 0,5%	-	-	-	X	-
Óleo de Limão 0,5%	-	-	-	-	X

C - Camarão congelado (controle); G - Camarão congelado com glaciamento; Q - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana; QT - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de tangerina; QL - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de limão.

Fonte: Própria do autor (2017).

3.3.4 Aplicações dos revestimentos e glaciamento nas amostras

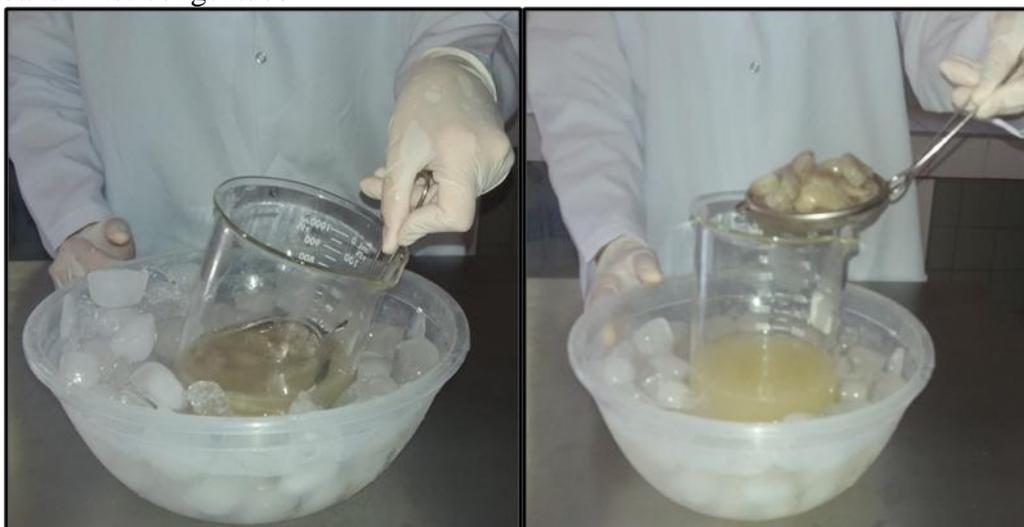
Em relação aos revestimentos as amostras foram submetidas a três diferentes tratamentos (revestimento de 1,5% de quitosana, revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de tangerina e revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de limão). O procedimento consistiu na retirada dos camarões congelados de cada bandeja com pinça estéril (FIGURA 18) e sua imersão na solução de cada revestimento separadamente a uma temperatura de $2^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 20 segundos (FIGURA 19).

Figura 18 – Camarões *Litopenaeus vanammei* congelados para aplicação dos revestimentos.



Fonte: Própria do autor (2016).

Figura 19 – Aplicação dos revestimentos por imersão nos camarões *Litopenaeus vanammei* congelados.



Fonte: Própria do autor (2016).

Em seguida à aplicação foi realizada a drenagem em peneira de malha de aço inoxidável por 20 segundos para a retirada do excesso de revestimento. Logo após a drenagem os camarões foram acondicionados novamente nas bandejas de isopor devidamente identificadas e envolvidas em filme de PVC. Para todos os revestimentos (1,5% de quitosana, 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de tangerina e 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de limão) foi realizado o mesmo procedimento. Para o glaciamento o procedimento foi semelhante à aplicação dos revestimentos, os camarões foram imersos em água destilada estéril a $2^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 20 segundos e submetidos à drenagem em peneira de malha de aço inoxidável também por 20 segundos (FIGURA 20) para a posterior embalagem da mesma

maneira utilizada nos revestimentos. Após a aplicação dos revestimentos e glaciamento as amostras foram armazenadas a -18°C por 180 dias.

Figura 20 – Aplicação do glaciamento (a) e procedimento de drenagem (b) em camarões *Litopenaeus vanammei* congelados.



Fonte: Própria do autor (2016).

3.3.5 Taxa de absorção (revestimentos e glaciamento), perda de peso, perda revestimento e perda de glaciamento

A taxa de absorção de revestimento, taxa de absorção de glaciamento, perda de peso, perda de revestimento e perda de glaciamento das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado (sem cabeça e descascado) foi determinada conforme Soares *et al.*, (2015).

3.3.5.1 Taxa de absorção de revestimento e glaciamento

3.3.5.1.1 Taxa de absorção de revestimento

A taxa de absorção de revestimento foi calculada utilizando 5 bandejas com 15 camarões *Litopenaeus vanammei* que foram pesados antes da aplicação de cada revestimento (W_1) e depois da aplicação de cada revestimento (W_2) de acordo com a equação (1) abaixo:

$$\text{Taxa de absorção de revestimento (\%)} = \frac{W_2 - W_1}{W_2} \times 100 \quad (1)$$

3.3.5.1.2 Taxa de absorção de glaciamento

Para o cálculo da taxa de absorção de glaciamento foram utilizadas 5 bandejas com 15 camarões *Litopenaeus vanammei* que foram pesados antes da aplicação do glaciamento (W3) e após a aplicação do glaciamento (W4) conforme a equação (2) abaixo:

$$\text{Taxa de absorção de glaciamento (\%)} = \frac{W_4 - W_3}{W_4} \times 100 \quad (2)$$

3.3.5.2 Perda de peso

Para a determinação da perda de peso foram utilizadas 5 bandejas com 15 camarões *Litopenaeus vanammei* que foram pesados antes do congelamento (W5) e depois do congelamento (W6) durante o período de estocagem (cada 30 dias) até 180 dias. A perda de peso foi calculada conforme a equação (3) abaixo:

$$\text{Perda de peso (\%)} = \frac{W_6 - W_5}{W_6} \times 100 \quad (3)$$

3.3.5.3 Perda de revestimento

Na determinação da perda de revestimento foram utilizadas 5 bandejas com 15 camarões *Litopenaeus vanammei* que foram pesados antes da aplicação de cada revestimento (W1), depois da aplicação de cada revestimento (W2) e após o período de estocagem (cada 30 dias) até 180 dias foram pesados novamente (W7) conforme a fórmula (4) abaixo:

$$\text{Perda de revestimento (\%)} = \frac{W_7 - W_2}{W_2 - W_1} \times 100 \quad (4)$$

3.3.5.4 Perda de glaciamento

Para a determinação da perda de glaciamento foram utilizadas 5 bandejas com 15 camarões *Litopenaeus vanammei* que foram pesados antes da aplicação do glaciamento (W3), depois da aplicação do glaciamento (W4) e após o período de estocagem (cada 30 dias) até 180 dias foram pesados novamente (W8) de acordo com a fórmula (5) a seguir:

$$\text{Perda de glaciamento (\%)} = \frac{W_8 - W_4}{W_4 - W_3} \times 100 \quad (5)$$

3.3.6 Análises químicas, físico-químicas e microbiológicas

As análises de composição química, pH, BVT, TMA, TBARS, e microbiológicas (contagem total de mesófilas e psicrotróficas, *Vibrio* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes) foram realizadas nas amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado no tempo inicial e durante 180 dias de estocagem.

3.3.6.1 Composição Química

A composição química (umidade, cinzas, proteínas e lipídios) das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* (sem cabeça e descascado) de cada tratamento foi realizada em quadruplicata no tempo inicial e final de estocagem de acordo com a metodologia da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005). Os valores referentes aos carboidratos foram obtidos pela diferença entre os demais componentes da composição química.

3.3.6.1.1 Umidade

A umidade (UM) foi determinada pelo método gravimétrico, descrito por Nagakura (1972). As amostras permaneceram em estufa de secagem a 105°C por 24h. Sendo a umidade calculada pela diferença entre o peso inicial e final das amostras, valor expresso em percentagem de acordo com a fórmula (6) abaixo:

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{V_1 - V_2}{V_1 - V_0} \times 100 \quad (6)$$

Onde: V_0 – peso do cadinho;

V_1 – peso do cadinho com amostra úmida;

V_2 – peso do cadinho com amostra seca

3.3.6.1.2 Cinzas

As cinzas (CZ) foram determinadas por incineração em forno mufla a 550° C por um período de 4h, de acordo com Nagakura (1972). O teor de cinzas foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final das amostras e expresso em percentagem de acordo com a equação (7) a seguir:

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0} \times 100 \quad (7)$$

Onde: V0 – peso do cadinho;

V1 – peso do cadinho com amostra úmida;

V2 – peso do cadinho com cinzas.

3.3.6.1.3 Proteínas

O teor de proteínas (PT) foi determinado pelo método semi-micro Kjeldahl. O método baseia-se na transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio por meio da digestão com ácido sulfúrico e posterior destilação com liberação da amônia fixada em solução ácida e quantificada por titulometria ácido-base. Após a titulação com ácido clorídrico 0,04 N o valor de nitrogênio total da amostra foi mensurado conforme equação (8) abaixo:

$$\text{Nitrogênio total (\%)} = \frac{(\text{Vol. da amostra} - \text{Vol. do branco}) \times 0,014 \times 0,04 \times \text{Fator HCl}}{\text{Peso da amostra}} \times 100 \quad (8)$$

Onde: Vol. da Amostra – volume de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra (mL)

Vol. do branco – volume de ácido clorídrico gasto na titulação do branco (mL)

Fator HCl – Fator de correção da solução de ácido clorídrico utilizada

A conversão do teor de nitrogênio total em proteínas (expresso em porcentagem) foi determinada através da multiplicação do valor de nitrogênio total pelo fator de 6,25 (fator de conversão para carnes) conforme fórmula (9) abaixo:

$$\text{Proteínas (\%)} = \% \text{ de Nitrogênio total} \times 6,25 \quad (9)$$

3.3.6.1.4 Lipídios (gorduras)

Os lipídios (LP) foram determinados pelo método de Soxlet, utilizando-se a acetona como solvente de extração. A extração foi realizada em determinador de gordura (Tecnal TE-044), onde foram ocoplados os *reboilers* receptores (tubos de vidro) por um período de 2 horas. E o percentual de lipídios foi calculado através da relação entre o peso final do lipídio e o peso inicial da amostra de acordo com a equação (10) a seguir:

$$\text{Lipídios (\%)} = \frac{\text{Peso do reboiler com gordura} - \text{Peso do reboiler vazio}}{\text{Peso da amostra}} \times 100 \quad (10)$$

3.3.6.1.5 Carboidratos

Conforme Vannucchi (1990), os carboidratos (CA) foram obtidos por diferença entre os demais componentes da composição química de acordo com a fórmula (11) abaixo:

$$\% \text{ Carboidratos} = 100 - (\% \text{ Umidade} + \% \text{ Cinzas} + \% \text{ Proteínas} + \% \text{ Lipídios}) \quad (11)$$

3.3.6.2 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* de acordo com o tratamento foi mensurado com o auxílio de potenciômetro digital (KASVI Modelo K39-2014B), as análises foram realizadas em quadruplicata no tempo inicial e a cada 30 dias de estocagem, a partir da homogeneização de 10 g da amostra macerada com 100 ml de água destilada, sendo em seguida realizada a leitura conforme a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005).

3.3.6.3 Nitrogênio das bases voláteis totais (N-BVT)

A quantificação das bases voláteis totais foi realizada pelo método de destilação com modificações (MALLE; TAO, 1987). A metodologia consistiu na preparação dos extratos de cada tratamento com 10 g de amostra de camarão pesada em balança analítica (Marca Ohaus), previamente triturados em multiprocessador e adicionados 90 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 7,5% (v/v). Essa mistura foi macerada e homogeneizada em gral de porcelana e permaneceu em repouso por 30 minutos. Em seguida o homogeneizado foi filtrado com papel de filtro pra a obtenção de extrato límpido. As análises foram realizadas no tempo inicial e a cada 30 dias de estocagem em quadruplicata, sendo adicionados nos tubos de destilação 25 ml de extrato e 5 ml de solução de hidróxido de sódio a 10% (p/v). Nos erlenmeyers foram adicionados 15 ml de ácido bórico 4% (p/v) com 0,04 ml de indicador misto (verde de bromocresol e vermelho de metila). A destilação foi realizada com o auxílio de destilador de Nitrogênio (TECNAL modelo TE-036/1) e ocorreu devido ao arraste de vapor onde foi obtido um destilado, que posteriormente foi coletado ao completar 50 ml. Para a titulação utilizou-se ácido sulfúrico a 0,05 M (v/v) até o ponto de viragem rosa pálido. Os resultados foram expressos em mg de N-BVT/100 g de camarão, coforme equação (12) a seguir:

$$N - BVT = \frac{14 \text{ g/mol} \times a \times b \times 300}{25 \text{ mL}} \text{ mg/100 g} \quad (12)$$

Onde: a – ml de H₂SO₄ utilizado na titulação;

b – normalidade do ácido sulfúrico.

3.3.6.4 Nitrogênio da trimetilamina (N-TMA)

Na quantificação da trimetilamina foi utilizada a metodologia de microdifusão de Conway com modificações (CONWAY; BYRNE, 1933). Os extratos de cada tratamento foram preparados com 50 g de amostra de camarão pesada em balança analítica (Marca Ohaus), previamente triturados em multiprocessador e adicionados 50 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (v/v). A mistura foi macerada e homogeneizada em gral de porcelana e permaneceu em repouso por 30 minutos. Posteriormente o homogeneizado foi filtrado com papel de filtro para a obtenção de extrato límpido. As análises foram realizadas no tempo inicial e a cada 30 dias de estocagem em quadruplicata. O procedimento de montagem das placas de microdifusão foi realizado primeiramente no compartimento interno, onde foram adicionados 2 mL de ácido bórico 1% (p/v) contendo indicador misto de Tashiro (verde de bromocresol e vermelho de metila) e no compartimento externo foram adicionados 2 mL do extrato e 2 mL de solução saturada de carbonato de potássio (p/v) e 1 mL de formol a 35% previamente neutralizado, com a função de quantificar somente a trimetilamina. Em seguida a adição dos reagentes, as placas foram prontamente vedadas com o auxílio de tampas de vidro, graxa de silicone e grampos metálicos, para então serem homogeneizadas e incubadas em estufa a $\pm 35^\circ \text{ C}$ por 2 horas. Após o tempo de incubação foi realizada a titulação do conteúdo das placas com uma solução de ácido clorídrico a 0,01 N (v/v). Os valores foram expressos em mg de N-TMA/100 g de camarão, de acordo com a equação (13) a seguir:

$$N - TMA = \frac{(V \times N \times 1400) \times (T - U)}{V_a \times P} \text{ mg/100 g} \quad (13)$$

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

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

T = volume (mL) da solução de TCA a 10% utilizada;

U = umidade da amostra;

Va = volume (mL) da alíquota do extrato;

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

3.3.6.5 Oxidação lipídica (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS)

Nas amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado (sem cabeça e descascado) a estabilidade oxidativa foi avaliada através das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) com modificações (VYNCKE, 1970).

Na preparação dos extratos de cada tratamento foram utilizados 10 g de amostra de camarão *Litopenaeus vanammei* pesada em balança analítica (Marca Ohaus), previamente triturados em multiprocessador e adicionados 50 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 7,5% (v/v). A mistura foi macerada e homogeneizada em gral de porcelana e o homogeneizado foi filtrado com papel de filtro para a obtenção de extrato límpido. Em seguida foram transferidos 5 mL do extrato filtrado e 5 mL de TBA 0,02M para tubos de ensaio com tampa, sendo homogeneizados com agitador de tubos (Quimis Q-220). No branco foi utilizado 5 mL de TBA 0,02 M e 5 mL de TCA 7,5% para calibrar o espectrofotômetro. Logo após os tubos foram aquecidos em banho-maria à temperatura de 90 °C por 10 minutos e o resfriamento foi realizado prontamente em imersão de água e gelo. As análises foram realizadas no tempo inicial e a cada 30 dias de estocagem em quadruplicata. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 532 nm. Para a determinação do valor de TBARS foi utilizada uma curva padrão de calibração a partir do reagente 1,1,3,3- tetraetoxipropano (TEP). Os valores foram expressos em mg de malonaldeído (MDA) / kg de camarão.

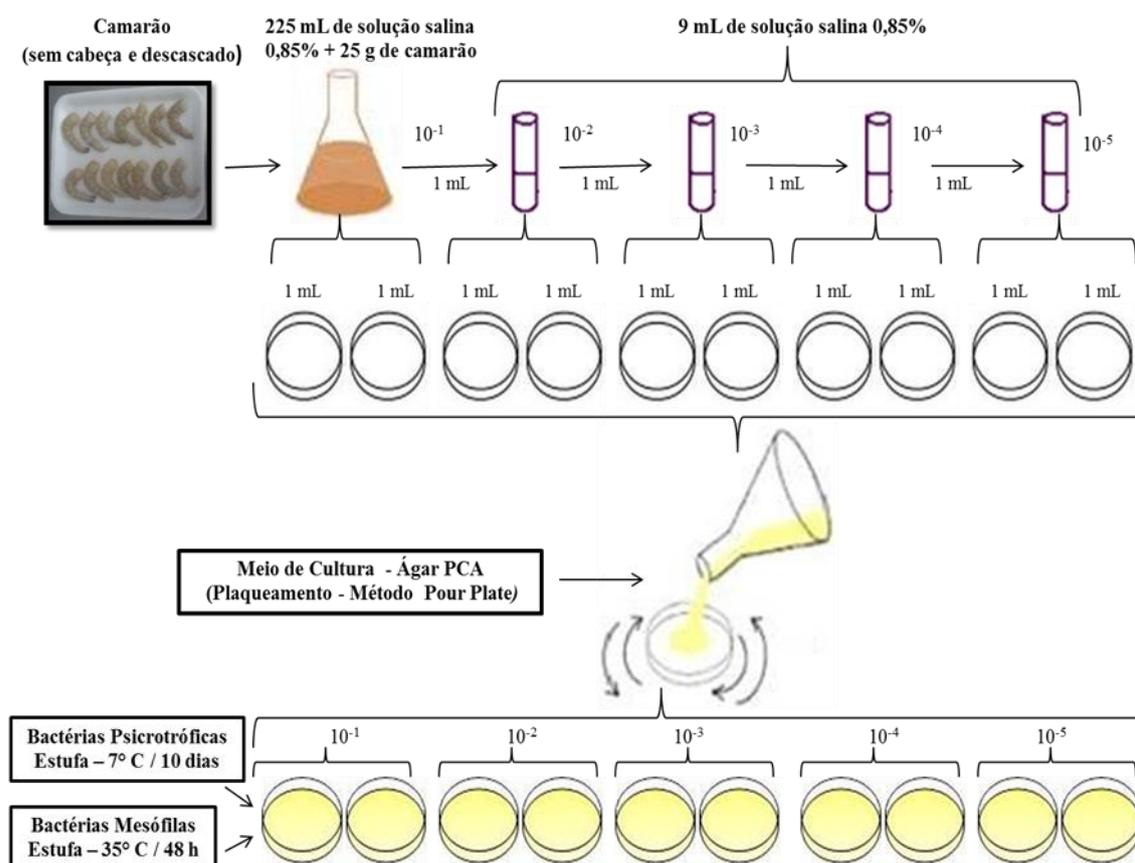
3.3.6.6 Análises microbiológicas

3.3.6.6.1 Contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis

As bactérias heterotróficas cultiváveis (mesófilas e psicotróficas) foram quantificadas de acordo com as normas da *American Public Health Association* (APHA), na quarta edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (DOWNES; ITO, 2001). Foram realizadas diluições com solução salina 0,85% variando de

10^1 a 10^5 nas amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* de cada tratamento no tempo inicial e a cada 30 dias estocagem. O plaqueamento foi realizado em meio Plate Count Ágar (PCA) pela técnica de *pour plate*. Conforme as diluições foi utilizada uma alíquota de 1 mL de cada diluição da amostra em cada placa e sobre esta 15 mL do meio de cultura. O procedimento foi realizado em duplicata conforme Figura 21 e as placas foram invertidas e incubadas a 7°C por 10 dias (psicrotróficas) e a 35°C por 48 horas (mesófilas).

Figura 21 – Fluxograma das análises de contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis nas amostras de camarão *Litopenaeus vanammei*.



Fonte: Própria do autor (2018).

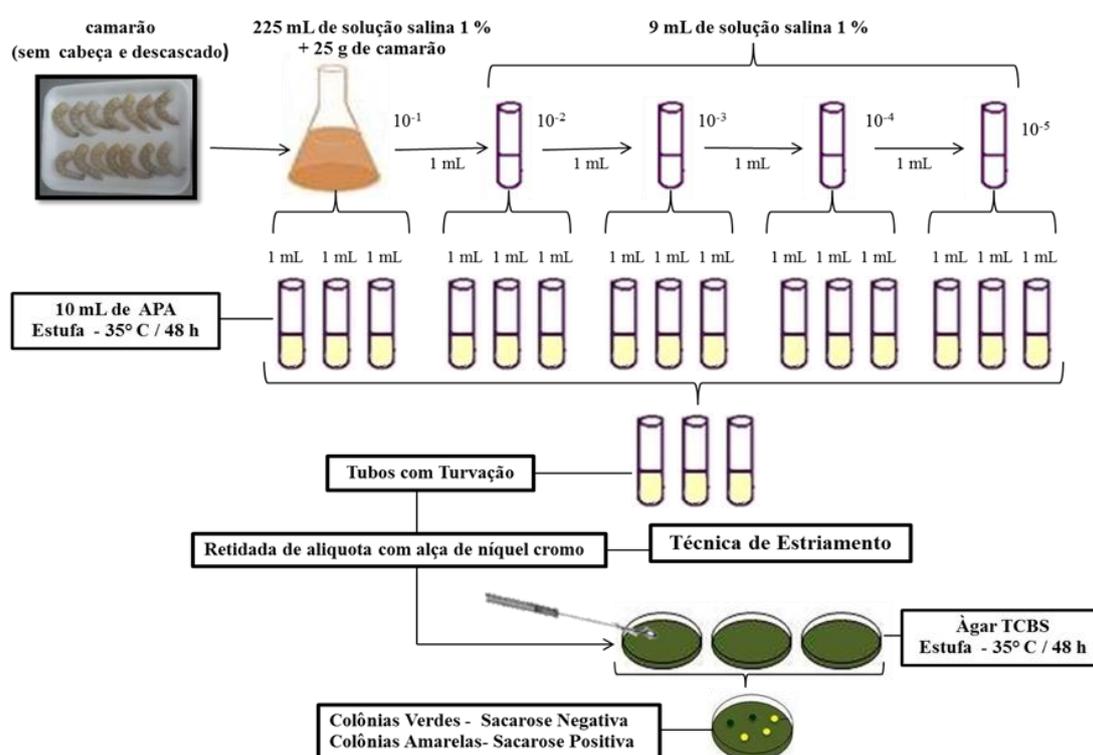
Após o período de incubação foram selecionadas para quantificação as placas com crescimento entre 25 e 250 unidades formadoras de colônias (UFC). O cálculo das bactérias heterotróficas cultiváveis (mesófilas e psicrotróficas) foi realizado pela expressão: UFC x inverso do fator de diluição, sendo UFC/g para cada tratamento.

3.3.6.6.2 *Vibrio* spp.

A presença de *Vibrio* spp. foi determinada através da turvação de tubos múltiplos e as diluições foram realizadas com solução salina 1% variando de 10^1 a 10^5 nas amostras de

camarão *Litopenaeus vanammei* de cada tratamento no tempo inicial e a cada 30 dias de estocagem (SILVA *et al.*, 2010). Para o teste presuntivo foi utilizado uma seqüência de 3 tubos de ensaio com Água Peptonada Alcalina (APA), que foram incubados em estufa a 35° C por 48 h. A partir da turvação em APA foram retiradas alíquotas com alça de níquel cromo e semeadas em placas de petri pela técnica de estriamento em Agar Tiosulfato-citrato-bile-sacarose (TCBS) com incubação em estufa a 35°C por 24 horas (FIGURA 22). Sobre a superfície do meio as colônias com crescimento característico de *Vibrio* spp. que apresentaram sacarose negativa (verdes) e/ou positiva (amarelas) foram contadas separadamente.

Figura 22 – Fluxograma das análises de *Vibrio* spp. nas amostras de camarão *Litopenaeus vanammei*.



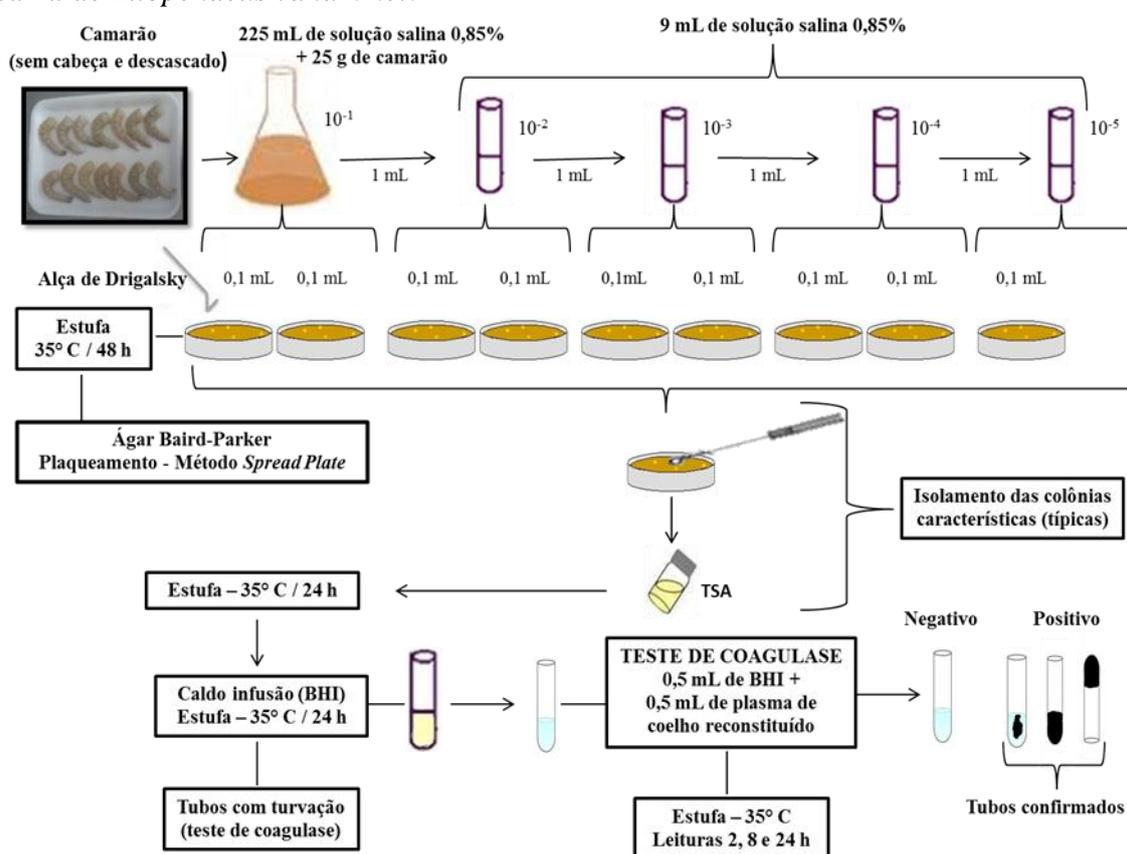
Fonte: Própria do autor (2018).

3.3.6.6.3 *Staphylococcus* coagulase positiva

Para a quantificação de *Staphylococcus* coagulase positiva foram realizadas diluições com solução salina 0,85% variando de 10^1 a 10^5 nas amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* de cada tratamento no tempo inicial e a cada 30 dias de estocagem. De acordo com a amostra foi utilizada uma alíquota de 100 μ L de cada diluição para

plaqueamento em meio de cultura Ágar Baird Parker pela técnica de *spread plate* (FIGURA 23). O procedimento foi realizado em duplicata e as placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 48 h (DOWNES; ITO, 2001). Após o período de incubação, as colônias consideradas típicas foram contadas e selecionadas. Posteriormente, as cepas foram isoladas em tubos de ensaio com Ágar Triptona de Soja (TSA) inclinado para incubação a 35°C por 24 h. Após a incubação os tubos foram repicados em caldo de infusão cérebro – coração (BHI) para incubação a 35°C por 24 h. Após este período foi realizado o teste de coagulase, através da reação com plasma de coelho (marca LABORCLIN) e com leituras de 2, 8 e 24 horas.

Figura 23 – Fluxograma das análises de *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras de camarão *Litopenaeus vanammei*.



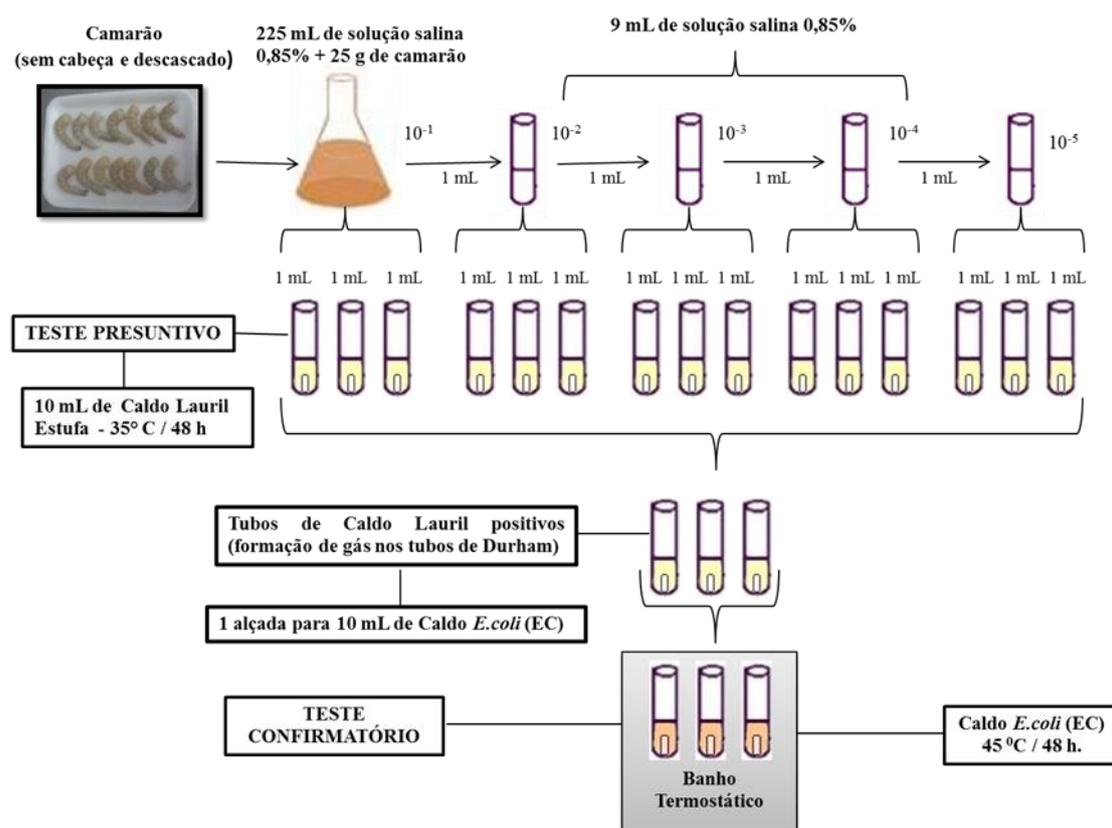
Fonte: Própria do autor (2018).

3.3.6.6.4 Coliformes termotolerantes

A quantificação de coliformes termotolerantes foi determinada pela técnica de tubos múltiplos de acordo com o método da *American Public Health Association* (APHA), descrito no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (KORNACKI; JOHNSON, 2001). As diluições foram realizadas com solução salina 0,85% variando de 10^1 a 10^5 nas amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* de cada tratamento no

tempo inicial e a cada 30 dias estocagem. Para o teste presuntivo foi utilizado uma seqüência de 3 tubos de ensaio com caldo Lauril Triptose e tubos de Durham invertidos em cada diluição, que foram incubados em estufa a 35°C por 48 h. Após o período de incubação, observou-se se havia ou não crescimento de microrganismos com produção de gás nos tubos de Durham. Quando o resultado apresentou-se positivo, os tubos positivos foram repicados para tubos com caldo *Escherichia coli* (EC) e tubos de Durham invertidos, sendo posteriormente incubados em banho termostático a 45°C por 48 horas de acordo com a Figura 24. A presença de coliformes termotolerantes foi determinada pelo crescimento de microrganismos com produção de gás nos tubos de Durham. Em caso de produção de gás (tubos positivos) foi determinado o valor do número mais provável (NMP) por grama utilizando a tabela de NMP de acordo com as diluições para expressão dos resultados.

Figura 24 – Fluxograma das análises de coliformes termotolerantes nas amostras de camarão *Litopenaeus vanammei*.



Fonte: Própria do autor (2018).

3.3.7 Análise estatística

Os dados (análises químicas e físico-químicas) foram tratados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey ao nível de 5% de significância foi utilizado para a comparação entre as médias. Na análise dos dados foi utilizado o software estatístico StatSoft STATISTICA versão 7.0.

3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Taxa de absorção de revestimentos e glaciamento em amostras de camarão congelado

As taxas de absorção dos revestimentos e do glaciamento das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* (sem cabeça e descascado) podem ser observadas na Tabela 17. A qualidade dos produtos alimentares congelados pode deteriorar-se durante a estocagem por vários motivos, tais como as flutuações na temperatura de estocagem, taxa de congelamento e descongelamento (BOONSUMREJ *et al.*, 2007). Os revestimentos de quitosana podem ser utilizados como uma espécie de glaciamento para retardar as alterações de qualidade do pescado congelado durante a estocagem (SATHIVEL *et al.*, 2007). O glaciamento pode ser definido como a aplicação de uma fina camada de gelo sobre a superfície de produtos congelados por imersão ou pulverização em água gelada, tendo a função de preservá-los da desidratação e oxidação (ZOLDOS *et al.*, 2011).

Tabela 17 – Taxa de absorção de revestimentos e glaciamento (média \pm desvio padrão) em amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado.

TRATAMENTO	Taxa de Absorção (%)
Q	13,83 \pm 0,62 ^b
QT	17,97 \pm 0,31 ^a
QL	16,96 \pm 0,48 ^a
G	7,59 \pm 0,34 ^c

Q - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana; QT - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de tangerina; QL - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de limão; G - Camarão congelado com glaciamento; Letras minúsculas diferentes na coluna das médias dos tratamentos indicam que existe diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Verificou-se que as taxas de absorção dos revestimentos nas amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado (sem cabeça e descascado) apresentaram valores distintos, sendo o revestimento de quitosana (Q) responsável pelo menor valor (13,82%), seguido pelo revestimento de quitosana com óleo de essencial de limão (QL) que apresentou 16,96% e o revestimento de quitosana com óleo essencial de tangerina (QT) apresentou a maior taxa de absorção de revestimento (17,97%). Em relação ao glaciamento a taxa de absorção alcançou o patamar de 7,59%, valor este bem menor em relação às taxas de absorção dos revestimentos. De acordo com os dados foi possível observar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as taxas

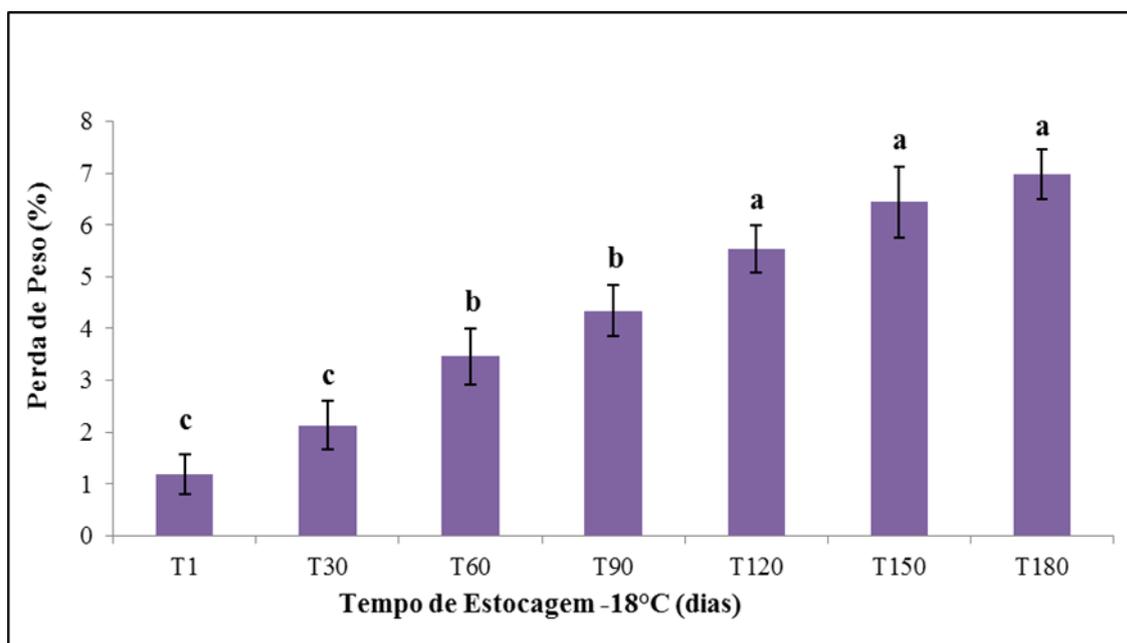
de absorção dos revestimentos (revestimento de quitosana apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com os revestimentos adicionados de óleos essenciais) e o glaciamento.

A taxa de aplicação do glaciamento na indústria geralmente apresenta variação em torno de 4 a 10%, dependendo do produto utilizado (GONÇALVES, 2011). Uma camada de gelo demasiadamente fina influencia na qualidade final do produto, quando a incorporação da camada de gelo é inferior a 6%, o glaciamento poderá não cumprir seu papel de proteção satisfatoriamente, resultando em um produto de qualidade inferior (VANHAECKE; VERBEKE; BRABANDER, 2010). Segundo a legislação brasileira a quantidade máxima de gelo permitida no glaciamento do pescado é de 20% (BRASIL, 2010). Gonçalves e Gindri Junior (2009) constataram que um percentual de 15% a 20% de glaciamento pode garantir a qualidade final de camarão congelado em estocagem congelada.

3.4.2 Perda de peso em amostras de camarão congelado

Os valores médios da perda de peso nas amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado (sem cabeça e descascado) do tratamento controle durante 180 dias de estocagem estão representados na Figura 25. A perda de peso é uma das propriedades físicas, que pode alterar a textura e os atributos sensoriais dos alimentos (FARAJZADEH *et al.*, 2016). A estocagem de camarões sob congelamento pode ocasionar perda de peso devido à sublimação do gelo superficial, provocando assim entraves provenientes da dessecação como a desnaturação das proteínas (JACOBSEN; FOSSAN, 2001).

Figura 25 - Perda de peso em amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado do tratamento controle durante 180 dias de estocagem.



Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) no período de estocagem.

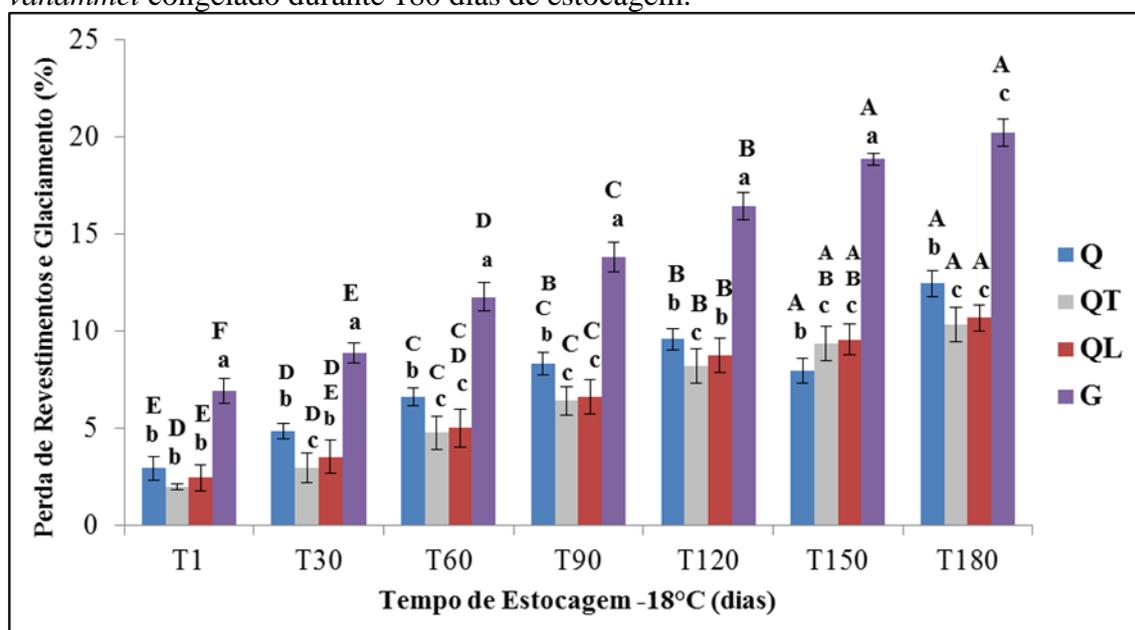
As amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado (sem cabeça e descascado) do tratamento controle (C) apresentaram valores crescentes de perda de peso durante os 180 dias de estocagem. No primeiro dia após a estocagem apresentaram 1,17% de perda de peso e ao final dos 180 dias de estocagem foi registrada uma perda de peso de 6,90%. Estes valores elevados de perda de peso provavelmente refletem possíveis flutuações de temperatura que ocorrerem no freezer onde estavam estocadas as amostras. Observou-se que os valores de perda de peso apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) a partir de 60 dias de estocagem, prevalecendo esta diferença em relação ao período inicial até o final da estocagem de 180 dias.

Apesar dos valores encontrados no presente trabalho serem bem mais elevados que os de Soares *et al.* (2015) encontrados para filé de salmão congelado observamos o mesmo comportamento crescente da perda de peso com o tempo de estocagem. Solval *et al.* (2014) também observaram em camarão (*Litopenaeus setiferus*) sob estocagem congelada o mesmo comportamento crescente de perda de peso conforme o tempo de estocagem. Em outro estudo com camarão *Litopenaeus vanammei* refrigerado, Farajzadeh *et al.* (2016) apresentaram percentuais de perda de peso inicial de 4,12% e final de 12,13%, valores estes bem superiores aos encontrados na presente pesquisa, mas também exibiram comportamento semelhante com valores de perda de peso crescentes com o aumento do tempo de estocagem.

3.4.3 Perda de revestimentos e glaciamento em amostras de camarão congelado

Os valores médios da perda de revestimentos e glaciamento em amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado (sem cabeça e descascado) durante 180 dias de estocagem podem ser observados na Figura 26. O glaciamento pode funcionar como uma barreira contra a desidratação e minimizar a oxidação e perda de qualidade (VANHAECKE; VERBEKE; BRABANDER, 2010). A utilização de revestimentos de quitosana como material de glaciamento pode contribuir para a preservação da qualidade do pescado durante estocagem congelada (SATHIVEL *et al.*, 2007; SOLVAL *et al.*, 2014).

Figura 26 - Perda de revestimentos e glaciamento em amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado durante 180 dias de estocagem.



Q - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana; QT - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de tangerina; QL - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de limão; G - Camarão congelado com glaciamento; Letras minúsculas diferentes nas colunas dos tratamentos do mesmo dia de estocagem indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos; Letras maiúsculas diferentes nas colunas dos tratamentos de mesma cor indicam que existe diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo de estocagem.

Os revestimentos de quitosana (Q), quitosana com óleo essencial de tangerina (QT) e quitosana com óleo essencial de limão (QL) que foram aplicados nas amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado (sem cabeça e descascado) apresentaram valores de perda de revestimento inferiores ao glaciamento (G) em todo o período de 180 dias de estocagem. Entre os revestimentos foi possível observar que o revestimento Q apresentou as maiores taxas de perda de revestimento, apresentando no primeiro dia após a estocagem 2,97% e 12,47% ao final de 180 dias de estocagem. O revestimento QL apresentou inicialmente 2,47% de perda de revestimento e 10,71% ao final da estocagem. E o

revestimento QT apresentou a menor taxa de perda revestimento com valor inicial de 2% e 10,34% ao final do período de estocagem. Vale ressaltar que a perda de glaciamento apresentou valores muito mais elevados que as perdas de revestimentos durante o armazenamento, pois no período inicial de estocagem chegou ao patamar de 6,92% e 13,85% ao final da estocagem. Valores estes considerados elevados para todos os tratamentos, mas que talvez possam ser elucidados pelas possíveis oscilações de temperatura no freezer onde estavam estocadas as amostras.

Foi verificado um comportamento inversamente proporcional entre a taxa de absorção dos revestimentos e glaciamento e a perda de revestimentos e glaciamento, ou seja, os tratamentos que alcançaram as maiores taxas de absorção obtiveram as menores taxas de perda. Os revestimentos Q, QL e QT apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) com o glaciamento (G) em todo o período de 180 dias estocagem. Sendo que também os revestimentos Q, QT e QL apresentaram diferenças entre si durante a estocagem. No período de 30 dias de estocagem o revestimento Q apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com o revestimento QT. Observa-se que o revestimento Q também apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com o revestimento QL no período de 120 dias de estocagem. E nos períodos de 60, 90, 150 e 180 dias de estocagem o revestimento Q apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com os revestimentos QT e QL.

Em relação à interação entre cada tratamento separadamente e o período de estocagem foi observado que os tratamentos G, Q, QT e QL apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) com os tempos de estocagem. Solval *et al.* (2014) observaram em estudo com amostras de camarão (*Litopenaeus setiferus*) em estocagem congelada que os revestimentos de quitosana apresentaram os melhores resultados, ou seja, menores taxas de perda que o glaciamento. Comportamento este também retratado por Soares *et al.* (2015) que em pesquisa com filé de salmão congelado comprovaram as menores taxas de perda de revestimentos em relação ao glaciamento. Em camarões *Litopenaeus vanammei* refrigerados Wang *et al.* (2018) verificaram que os revestimentos de quitosana com carvacrol (componente presente em diversos óleos essenciais) apresentaram menor taxa de perda que o revestimento de quitosana pura.

3.4.4 Análises químicas, físico-químicas e microbiológicas

3.4.4.1 Composição química das amostras de camarão congelado

A composição química das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado (sem cabeça e descascado) submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem (expressa pelos teores de umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e carboidratos) está representada na Tabela 18.

Tabela 18 - Composição química (média \pm desvio padrão) das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem

%	TEMPO (dias)	TRATAMENTOS				
		C	G	Q	QT	QL
UM	1	79,07 \pm 0,24 ^{aAB}	80,14 \pm 0,68 ^{aA}	79,88 \pm 0,84 ^{aAB}	80,03 \pm 0,81 ^{aA}	79,81 \pm 0,76 ^{aAB}
	180	78,67 \pm 0,20 ^{aB}	79,69 \pm 0,50 ^{aAB}	78,99 \pm 0,56 ^{aAB}	79,14 \pm 0,15 ^{aAB}	78,97 \pm 0,80 ^{aAB}
CZ	1	1,24 \pm 0,42 ^{aA}	1,27 \pm 0,38 ^{aA}	1,05 \pm 0,44 ^{aAB}	1,11 \pm 0,41 ^{aAB}	1,13 \pm 0,44 ^{aAB}
	180	1,58 \pm 0,54 ^{aA}	1,33 \pm 0,20 ^{aA}	1,48 \pm 0,38 ^{aA}	1,47 \pm 0,60 ^{aA}	1,78 \pm 0,51 ^{aA}
LP	1	1,95 \pm 0,31 ^{aAB}	1,32 \pm 0,53 ^{aB}	1,37 \pm 0,29 ^{aAB}	1,40 \pm 0,43 ^{aAB}	1,57 \pm 0,57 ^{aAB}
	180	2,11 \pm 0,17 ^{aA}	1,81 \pm 0,07 ^{aAB}	1,88 \pm 0,30 ^{aAB}	1,93 \pm 0,40 ^{aAB}	1,91 \pm 0,50 ^{aAB}
PT	1	17,44 \pm 0,31 ^{aA}	17,00 \pm 0,88 ^{aA}	17,28 \pm 0,19 ^{aA}	17,10 \pm 0,10 ^{aA}	17,02 \pm 0,37 ^{aA}
	180	17,25 \pm 0,27 ^{aA}	16,78 \pm 0,41 ^{aA}	17,15 \pm 0,31 ^{aA}	16,99 \pm 0,42 ^{aA}	16,85 \pm 0,54 ^{aA}
CA	1	0,30 \pm 0,04 ^{aAB}	0,27 \pm 0,12 ^{aB}	0,43 \pm 0,10 ^{aAB}	0,36 \pm 0,05 ^{aAB}	0,46 \pm 0,12 ^{aAB}
	180	0,38 \pm 0,11 ^{aAB}	0,39 \pm 0,14 ^{aAB}	0,50 \pm 0,16 ^{aA}	0,47 \pm 0,07 ^{aAB}	0,48 \pm 0,07 ^{aAB}

UM – Umidade; CZ – Cinzas; LP – Lipídios; PT – Proteínas; CA – Carboidratos; C - Camarão congelado (controle); G Camarão congelado com glaciamento; Q - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana ; QT - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de tangerina; QL - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de limão; Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que não existe diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos; Letras maiúsculas iguais nas colunas dos tratamentos indicam que não existe diferença significativa ($p>0,05$) em relação ao tempo de estocagem.

Observou-se que as amostras de camarão dos tratamentos controle (C), glaciamento (G), quitosana (Q), quitosana com óleo essencial de tangerina (QT) e quitosana com óleo essencial de limão (QL) durante a estocagem (1 e 180 dias) apresentaram pequena variação, dentre as quais, respectivamente: a umidade ficou entre 78,67 e 80,14%; cinzas entre 1,05 e 1,78%; lipídeos entre 1,32 e 2,11 %; proteínas entre 16,78 e 17,44% e os carboidratos entre 0,27 e 0,50%.

A composição química do pescado pode apresentar considerável variação em função de diversos fatores, tais como as condições sazonais, habitat, nutrição, espécie, tamanho, gênero e idade (OGAWA; MAIA, 1999). Mohebi e Shahbazi (2017) ao analisarem amostra de camarão descascado proveniente do Irã encontraram valores médios de 76,6% de umidade, 1,32% de cinzas, 0,95% de lipídios e 19,2% de proteínas, enquanto, enquanto Alparslan *et al.* (2016) trabalhando com amostras de camarão rosa (*Parapenaeus longirostris*) em estocagem refrigerada encontraram valores entre 71,82% e 74,21 de umidade, 1,64 e 2,15 % de cinzas, 1,35 e 1,52 % de lipídios e 18,29% e 23,79 de proteínas. Em amostra de camarão *Penaeus brasiliensis* (in natura) Pedrosa e Cozzolino (2001) observaram 88,34% de umidade, 1,05% de cinzas, 0,36% de lipídios e 10,62% de proteínas. Solval *et al.* (2014) com a espécie (*Litopenaeus setiferus*) observaram teores médios de 77,18% de umidade, 1,78 % de cinzas, 1,12 % de lipídios e 18,57% de proteínas. Em outra pesquisa com a espécie *Litopenaeus vanammei* Vasconcelos e Silveira (2004) encontraram valores de 75,96% de umidade, 1,55% de cinzas, 2,45% de lipídios e 17,83% de umidade. Vale salientar que os estudos mencionados não relataram teores de carboidratos na composição química de suas amostras, mas Moucherek Filho *et al.* (2003) em estudo com amostras de camarão adquiridas no Mercado Central de São Luís do Maranhão relataram valor médio de 1,1% de carboidratos, além dos outros componentes que apresentaram 78,8% de umidade, 1,4 % de cinzas, 0,1 % de lipídios e 18,3 % de proteínas.

Os componentes da composição química (umidade, cinzas, lipídios, proteínas e carboidratos) dos tratamentos C, G, Q, QT e QL apresentaram comportamento semelhante durante o período de 180 dias de estocagem. Foi possível observar um decréscimo nos teores de umidade e proteínas durante o período de estocagem mencionado. Em relação às cinzas e lipídios ocorreu um acréscimo nos valores durante o período de estocagem mencionado. Os carboidratos calculados por diferença entre os demais componentes da composição química apresentaram acréscimo nos valores entre o primeiro e último dia de estocagem. Salientando que a composição química dos tratamentos (C, G, Q, QT e QL) apresentou excelente qualidade nutricional, principalmente devido ao baixo valor de lipídios e alto valor de proteínas. Pois segundo Stansby (1962) todos os tratamentos avaliados podem ser classificados na categoria A, que inclui pescado com baixo teor de lipídios (< 5%) e alto teor de proteínas (15 –20%).

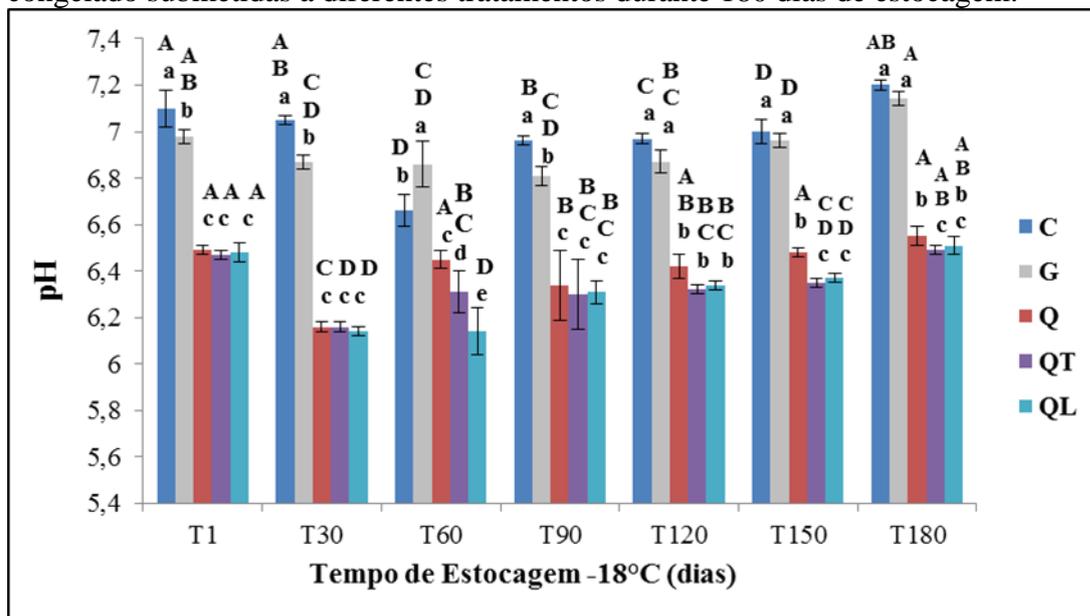
Os tratamentos C, G, Q, QT e QL não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) nos valores de umidade no primeiro dia após a estocagem. E no final do período de

estocagem de 180 dias todos os tratamentos também não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre si, mas na umidade utilizando a interação entre o tempo e o tratamento observou-se que o tratamento C no final do período de estocagem (180 dias) representando o menor valor de umidade (78,67%) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) com os tratamentos G (80,14%) e QT (80,03%) no primeiro dia após estocagem, tratamentos estes que apresentaram os maiores valores de umidade. Em relação às cinzas os tratamentos C, G, Q, QT e QL não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) durante estocagem. Os lipídios também não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos C, G, Q, QT e QL no primeiro dia após estocagem e também não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) no final do período de estocagem de 180 dias. Porém a interação entre o tempo e os tratamentos demonstrou que os lipídios do tratamento C (2,11%) do final do período de 180 dias de estocagem apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) com o tratamento G (1,32%) do primeiro dia após a estocagem. Os carboidratos dos tratamentos C, G, Q, QT e QL não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) no primeiro dia após a estocagem. No período final de 180 dias de estocagem os carboidratos também não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Todavia os carboidratos do tratamento G (0,27%) do primeiro dia após a estocagem apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) com o tratamento Q (0,50%) do período final de 180 dias de estocagem na interação entre o tempo e os tratamentos. E as proteínas não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos C, G, Q, QT e QL no início e final do período de estocagem.

3.4.4.2 Potencial hidrogeniônico (pH) de amostras de camarão congelado

Os valores médios de pH das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado (sem cabeça e descascado) submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem podem ser observados na Figura 27.

Figura 27 – Valores médios de pH das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.



C - Camarão congelado (controle); G - Camarão congelado com glaciamento; Q - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana; QT - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de tangerina; QL - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de limão; Letras minúsculas diferentes nas colunas dos tratamentos do mesmo dia de estocagem indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos; Letras maiúsculas diferentes nas colunas dos tratamentos de mesma cor indicam que existe diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo de estocagem.

Os valores de pH dos tratamentos C e G apresentaram uma variação de 6,66 a 7,20 e os tratamentos Q, QT e QL apresentaram uma variação de 6,14 a 6,55. Assim percebe-se que as amostras revestidas com quitosana e óleos essenciais, representadas pelos tratamentos (Q, QT e QL) apresentaram valores de pH bem inferiores (melhor estado de frescor) que os tratamentos controle (C) e glaciamento (G) em todo o período de estocagem.

Segundo Goswami *et al.* (2001) valores de pH inferiores a 7,2 correspondem a um produto (camarão) de excelente qualidade e valores de pH entre 7,7 e 7,95 indicam perda de qualidade, mas o produto ainda é aceitável para o consumo. De acordo com a legislação brasileira vigente o valor de pH para crustáceos frescos deve ser inferior a 7,85 (BRASIL, 2017). Observou-se que os valores de pH das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* dos tratamentos controle (C), glaciamento (G), quitosana (Q), quitosana com óleo essencial de tangerina (QT) e quitosana com óleo essencial de limão (QL) estão abaixo da legislação vigente e evidenciaram o bom estado de frescor das amostras analisadas, destacando as amostras revestidas com quitosana e óleos essenciais (Q, QT e QL) que apresentaram os menores valores de pH (melhor estado de frescor) durante todo o período de 180 dias estocagem.

O pH de todos os tratamentos (C, G, Q, QT e QL) apresentou um comportamento semelhante e verificou-se que durante a estocagem ocorreu uma manutenção do pH. Os valores de pH foram inferiores ao período inicial de estocagem em 30, 60, 90, 120 e 150 dias de estocagem e somente ao final do período de estocagem de 180 dias os valores foram mais elevados que o período inicial de estocagem.

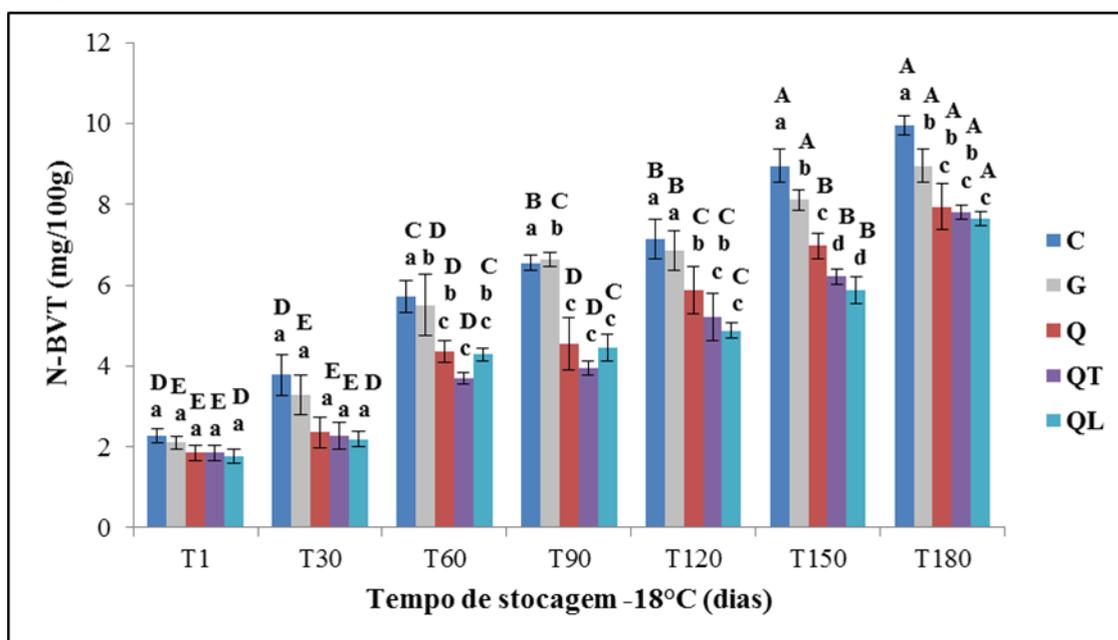
Em termos de pH, os tratamentos C e G apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) com os tratamentos com quitosana e óleos essenciais (Q, QT e QL) em todo o período de estocagem (1, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias). O tratamento C também apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com o tratamento G no primeiro dia após a estocagem e nos períodos de 30, 60 e 90 dias de estocagem. Em relação aos tratamentos com quitosana e óleos essenciais (Q, QT e QL) foi observado diferenças significativas ($p < 0,05$) entre si em três períodos de estocagem (60, 150 e 180 dias). No período de 60 dias de estocagem os tratamentos Q, QT e QL apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre si. Em relação ao período de 150 dias de estocagem o tratamento Q apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com os tratamentos QT e QL. E ao final do período de 180 dias de estocagem o tratamento Q apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) com o tratamento QT.

Wu (2014) em pesquisa com revestimento de quitosana (quitosana + quitooligossacarídeo + glutadiona) em camarão (*Penaeus vanammei*) observaram que o pH dos tratamentos apresentou acréscimo nos valores durante estocagem semi congelada, ressaltando a melhor qualidade da amostra revestida, ou seja, menor valor de pH que a amostra controle (não revestida). Estudo realizado em amostras de camarão (*Litopenaeus setiferus*) congeladas submetidas a diferentes tratamentos demonstrou que os valores de pH dos tratamentos aumentaram a cada 30 dias durante o período de armazenamento de 120 dias, salientando que as amostras de camarão revestidas com quitosana também apresentaram menores valores de pH (abaixo de 7) do que as amostras sem revestimento que registraram pH acima de 7 em todo o período de estocagem (CHOULJENKO *et al.*, 2017). De acordo com Solval *et al.* (2014) o pH de todas as amostras de camarão (*Litopenaeus setiferus*) em estocagem congelada aumentou após 30 dias de estocagem, mas as amostras sem revestimento e as glaciadas apresentaram valores mais elevados que as amostras revestidas com quitosana que mais uma vez evidenciaram sua melhor qualidade. Em relação aos revestimentos de quitosana, Wang *et al.* (2018) registraram que as amostras de camarão (*Litopenaeus vannamei*) revestidas com quitosana e carvacrol apresentaram menores valores de pH que as amostras revestidas com quitosana pura ao longo do período de estocagem refrigerada.

3.4.4.3 Bases voláteis totais (N-BVT) e trimetilamina (N-TMA) das amostras de camarão congelado

Os dados de BVT (mg/100g) das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado (sem cabeça e descascado) submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem estão representados na Figura 28. A quantificação das bases nitrogenadas voláteis totais (N-BVT) é uma metodologia química constantemente utilizada para determinar o frescor do pescado (GALVÃO; OETTERER, 2014).

Figura 28 - Valores médios de N-BVT das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.



C - Camarão congelado (controle); G - Camarão congelado com glaciamento; Q - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana; QT - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de tangerina; QL - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de limão; Letras minúsculas diferentes nas colunas dos tratamentos do mesmo dia de estocagem indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos; Letras maiúsculas diferentes nas colunas dos tratamentos de mesma cor indicam que existe diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo de estocagem.

Os tratamentos controle (C) e Glaciamento (G) apresentaram valores próximos, respectivamente uma variação de 2,27 a 9,95 mg de N/100g e 2,10 a 8,95 mg/100g. E os tratamentos de quitosana (Q), quitosana com óleo essencial de tangerina (QT) e quitosana com óleo essencial de limão (QL) apresentaram valores muito semelhantes respectivamente com uma variação de 1,85 a 7,94 mg de N/100g, 1,85 a 7,81 mg de N/100g e 1,76 a 7,64 mg de N/100g. Os níveis de BVT das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado dos tratamentos C, G, Q, QT e QL apresentaram valores crescentes durante período de 180 dias de

estocagem e bem abaixo da faixa aceitável pela legislação brasileira para pescado fresco que estabelece valor inferior a 30mg de N/100g de carne (BRASIL, 2017).

No primeiro dia após a estocagem os valores de N-BVT dos tratamentos C, G, Q, QT e QL apresentaram valores praticamente iguais e não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) entre si. Os tratamentos C e G apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$) com os tratamentos Q, QT e QL a partir de 30 dias de estocagem até o final de 180 dias de estocagem. O tratamento C apresentou diferenças significativas ($p<0,05$) com o tratamento G nos períodos de 150 e 180 dias de estocagem. Em relação aos tratamentos com quitosana e óleos essenciais foi observado que o tratamento Q apresentou diferenças significativas ($p<0,05$) com o tratamento QL no período de 120 dias de estocagem e com os tratamentos QT e QL no período de 150 dias de estocagem.

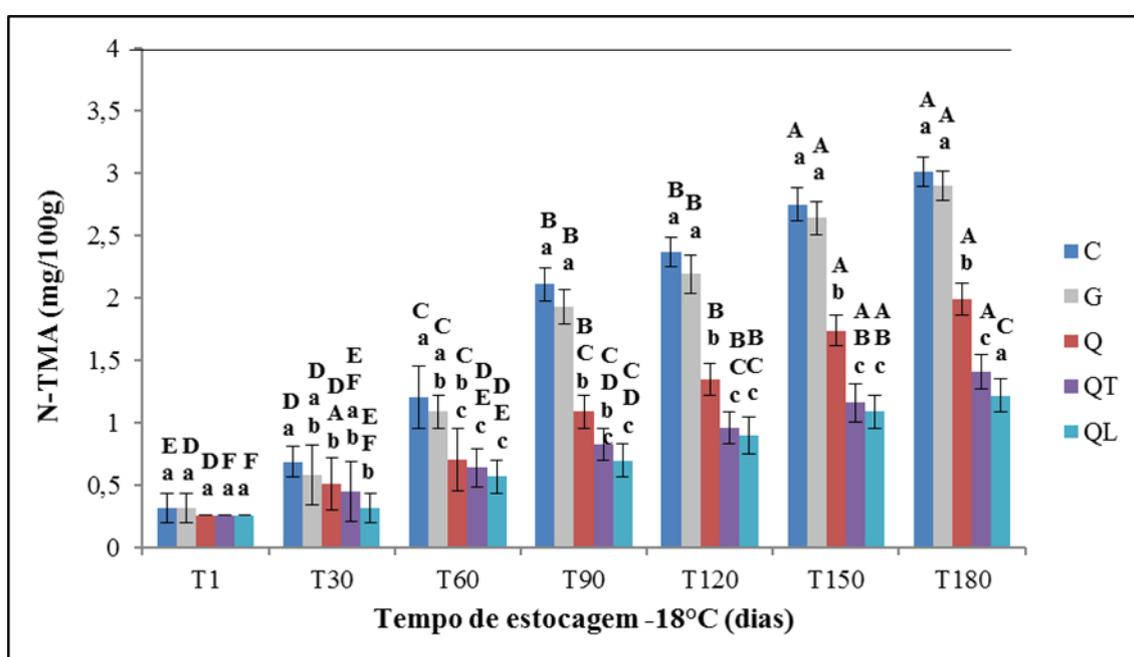
De acordo com os valores de N-BVT apresentados pelos tratamentos C, G, Q, QT e QL foi constatado um excelente estado de frescor, abaixo de 10 mg de N/100g no final do período de 180 dias de estocagem. Enfatizando o melhor desempenho dos tratamentos com quitosana e óleos essenciais (Q, QT e QL) que apresentaram os menores valores (melhor estado de frescor) durante todo o período de estocagem, em destaque os valores de N-BVT abaixo de 8 mg de N/100g ao final de 180 dias de estocagem.

Amostras de camarão *Litopenaeus vannamei* submetidas a três formas de congelamento (nitrogênio líquido, túnel de congelamento e freezer doméstico) apresentaram valores crescentes de BVT conforme o aumento do tempo de estocagem com valores iniciais entre 3,69 e 6,01 mg/100g e ao final de 90 dias de estocagem entre 14,45 e 16,02mg N/100g de BVT (valores dentro do limite aceitável), indicando boa qualidade em termos de frescor ao final do período de estocagem (QUEIROGA *et al.*, 2014). Wu (2014) ao avaliar o efeito do revestimento de quitosana (quitosana + quito-oligossacarídeo + glutadiona) em camarão (*Penaeus vannamei*) observaram que os tratamentos apresentaram valores crescentes de BVT durante estocagem semi congelada, ambos registraram valor inicial de 3,2 mg /100g e ao final do período de estocagem a amostra controle (sem revestimento) atingiu o valor de 36,5 mg/100g (acima da faixa aceitável pela legislação) e a amostra revestida com quitosana registrou um valor de 12,6 mg/100 g (bem abaixo da faixa aceitável) que pode evidenciar a ação da quitosana na manutenção do frescor ao longo do período de estocagem. Berizi *et al.* (2018) em estudo com truta arco-íris verificaram que todos os tratamentos analisados apresentaram valores de BVT dentro do limite aceitável durante estocagem congelada de 180

dias, em destaque as amostras revestidas com quitosana que apresentaram valores de BVT inferiores ao tratamento controle (sem revestimento). E Wang *et al.* (2018) analisando amostras de camarão (*Litopenaeus vannamei*) submetidas a diferentes tratamentos em estocagem refrigerada observaram que todos os tratamentos apresentaram o mesmo valor de BVT inicialmente, mas ao longo do período de estocagem a amostra controle (sem revestimento) registrou os maiores valores e entre os revestimentos a amostra revestida com quitosana e carvacrol apresentou o melhor comportamento, ou seja, os menores valores de BVT durante estocagem.

Os teores de TMA (mg/100g) das amostras de camarão *Litopenaeus vannamei* congelado (sem cabeça e descascado) submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem podem ser observados na Figura 29. A Trimetilamina (TMA) é um composto básico volátil encontrado em pequenas quantidades em pescado fresco, sendo o componente responsável pelo odor característico em pescado *in natura* (GALVÃO; OETTERER, 2014).

Figura 29 - Valores médios de N-TMA das amostras de camarão *Litopenaeus vannamei* congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.



C - Camarão congelado (controle); G - Camarão congelado com glaciamento; Q - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana; QT - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de tangerina; QL - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de limão; Letras minúsculas diferentes nas colunas dos tratamentos do mesmo dia de estocagem indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos; Letras maiúsculas diferentes nas colunas dos tratamentos de mesma cor indicam que existe diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo de estocagem.

Foi observado que os tratamentos controle (C) e o Glaciamento (G) apresentaram valores semelhantes, respectivamente uma variação de 0,32 a 3,01 mg de N/100g e 0,32 a 2,90 mg de N/100g. Sendo que os tratamentos com quitosana (Q), quitosana com óleo essencial de tangerina (QT) e quitosana com óleo essencial de limão (QL) apresentaram valores próximos (menores valores) respectivamente com uma variação de 0,26 a 1,99 mg de N/100g, 0,26 a 1,41 mg de N/100g e 0,26 a 1,22 mg de N/100g.

Os teores de TMA nas amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado (sem cabeça e descascado) dos tratamentos C, G, Q, QT e QL apresentaram valores crescentes durante período de 180 dias de estocagem e dentro da faixa aceitável pela legislação brasileira que estabelece o limite de 4mg de N/100g de carne para pescado fresco (BRASIL, 1962). No período inicial de estocagem os valores de N-TMA dos tratamentos C, G, Q, QT e QL apresentaram valores semelhantes e não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre si. No 30° dia de estocagem o tratamento C apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas com o tratamento QL. Os tratamentos C e G apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) com os tratamentos Q, QT e QL nos períodos de 60, 90, 120, 150 e 180 dias de estocagem. Em relação aos tratamentos com quitosana e óleos essenciais foi observado que o tratamento Q apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com o tratamento QL no período de 90 dias de estocagem. Sendo também possível observar que o tratamento Q apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com os tratamentos QT e QL nos períodos de 120, 150 e 180 dias de estocagem.

Conforme os valores de N-TMA apresentados pelos tratamentos C, G, Q, QT e QL foram verificados que as amostras de camarão de todos os tratamentos podem ser consideradas frescas durante os 180 dias de estocagem, ressaltando os tratamentos com quitosana e óleos essenciais (Q, QT e QL) que apresentaram os menores valores TMA. Os tratamentos C e G apresentaram valores em torno de 3 mg de N/100g no final do período de 180 dias de estocagem. Ressaltando o melhor desempenho dos tratamentos com quitosana e óleos essenciais (Q, QT, QL) que apresentaram as menores quantidades de TMA, respectivamente ao final da estocagem de 180 dias os valores de 2 mg de N/100g, 1,42 mg de N/100g e 1,23 mg de N/100g.

Zhang *et al.* (2015) constataram que as amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* analisadas apresentaram valores crescentes de TMA conforme o aumento do tempo de estocagem ao longo de 100 dias de estocagem congelada. Huidobro *et al.* (2002) avaliando

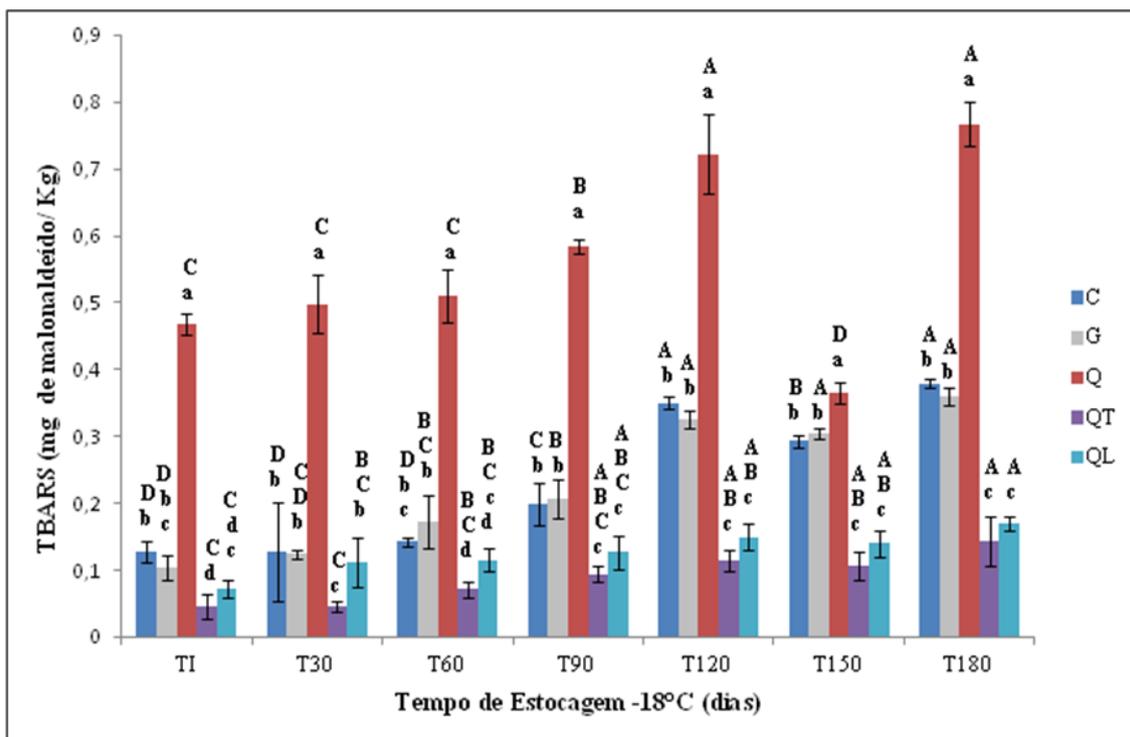
os valores de TMA em amostras de camarão rosa (*Parapenaeus longirostris*) sob estocagem refrigerada observaram valores iniciais de TMA de 0,23 e 0,47 mg de N/100g, atingindo respectivamente ao final da estocagem os valores de 0,53 e 2,91 mg de N/100g de TMA. As amostras de camarão (*Penaeus vanammei*) submetidas aos tratamentos com oligossacarídeos de quitosana apresentaram menores teores de TMA que a amostra controle (sem revestimento) ao longo do período de estocagem refrigerada (SUN *et al.*, 2017). Em pesquisa com revestimentos de quitosana e óleo essencial de cravo, Yu *et al.* (2018) observaram que os revestimentos de quitosana inibiram o acúmulo de TMA em filés de carpa capim (*Ctenopharyngodon idellus*), e o efeito inibitório foi melhorado com a incorporação do óleo essencial de cravo ao revestimento de quitosana, pois as amostras revestidas apresentaram menores teores de TMA que a amostra controle (sem revestimento) durante estocagem refrigerada.

Quer para o controle (C) quer para os tratamentos G, Q, QT e QL, os níveis de BVT e TMA, no início do experimento, apresentaram valores muito baixos, próprios de camarão com alto grau de frescor, mantendo-se na faixa aceitável ao longo do período de 180 dias de estocagem. Vale salientar que as amostras revestidas com quitosana e óleos essenciais (Q, QT e QL) apresentaram a melhor qualidade entre os tratamentos, ou seja, os menores teores de BVT e TMA.

3.4.4.4 Oxidação lipídica das amostras de camarão congelado

Os valores médios de TBARS (mg / malonaldeído / kg) das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado (sem cabeça e descascado) submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem estão representados na Figura 30.

Figura 30 - Valores médios de TBARS das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.



C - Camarão congelado (controle); G - Camarão congelado com glaciamento; Q - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana; QT - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de tangerina; QL - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de limão; Letras minúsculas diferentes nas colunas dos tratamentos do mesmo dia de estocagem indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos; Letras maiúsculas diferentes nas colunas dos tratamentos de mesma cor indicam que existe diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo de estocagem.

A longo do período de estocagem pode ocorrer a deterioração dos lipídios existentes nos alimentos devido à ação de enzimas hidrolíticas, oxidação pelo contato com oxigênio ou pela presença de micro-organismos (SANTOS *et al.*, 2017). No processo de oxidação lipídica, os produtos primários são representados principalmente pelos hidroperóxidos, que são rapidamente decompostos em várias substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo o malonaldeído (MDA) o principal elemento (ROTTA, 2007). Metodologias com o ácido tiobarbitúrico (TBA) são extensivamente utilizadas para determinar o nível de oxidação lipídica (SALLAM, 2007). Ressaltando que o Brasil não possui uma legislação específica para TBARS, mas como valores elevados do mesmo podem provocar rancidez, odores desagradáveis e acúmulo de produtos indesejáveis potencialmente tóxicos, assim a investigação desse indicador de qualidade é de primordial importância. Segundo Connell (1995), valores de TBA entre 1 e 2 mg MAD / kg podem estar associados as alterações de qualidade nas características sensoriais do pescado.

Todos os tratamentos apresentaram valores de TBARS inferiores a 1 mg/malonaldeído/kg durante todo o período de estocagem. Os tratamentos controle (C) e congelamento (G) apresentaram valores próximos que variaram de 0,10 a 0,38 mg/malonaldeído/kg. O tratamento de quitosana sem adição de óleos essenciais (Q) apresentou a maior variação de 0,36 a 0,77 mg/malonaldeído/kg e valores mais elevados de TBARS em todo o período de estocagem, superando inclusive os tratamentos C e G. Os tratamentos com quitosana e óleos essenciais de tangerina e limão, respectivamente QT e QL, apresentaram comportamento semelhante, com os menores valores de TBARS durante 180 dias de estocagem e variação de 0,04 a 0,17 mg/malonaldeído/kg. De acordo com os dados foi possível verificar que os tratamentos controle (C), congelamento (G), quitosana (Q), quitosana com óleo essencial de tangerina (QT) e quitosana com óleo essencial de limão (QL) apresentaram valores crescentes de TBARS até 120 dias de estocagem, sendo possível observar um decréscimo nos valores de TBARS em 150 dias de estocagem. E ao final de 180 dias de estocagem ocorreu um acréscimo nos valores que superaram os resultados já apresentados.

O tratamento C não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com o tratamento G durante estocagem de 180 dias, porém o tratamento C apresentou diferenças significativas com os tratamentos com quitosana e óleos essenciais (Q, QT e QL) em 1, 90, 120, 150 e 180 dias de estocagem e apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas com Q e QT nos períodos de 30 e 60 dias de estocagem. Foi possível observar no tratamento G o mesmo comportamento do tratamento C nos períodos de estocagem de 30, 90, 120, 150 e 180 dias de estocagem, mas no primeiro dia após estocagem o tratamento G apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas com Q e QT e em 60 dias de estocagem apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com Q, QT e QL. O tratamento Q apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com os tratamentos C, G, QT e QL em todo o período de estocagem. Vale salientar que no período de 150 dias de estocagem o tratamento Q apresentou considerável decréscimo no valor de TBARS em relação ao período anterior de 120 dias de estocagem e apesar de apresentarem menor decréscimo, os demais tratamentos (C, G, QT e QL) configuraram o mesmo comportamento. E os tratamentos de quitosana adicionados de óleos essenciais QT e QL apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre si apenas no período de 30 dias de estocagem.

Os resultados mostraram baixas quantidades de TBARS no período de 180 dias de estocagem em todos os tratamentos (C, G, Q, QT e QL). Queiroga *et al.* (2014) registraram

baixos valores de TBA em amostras de camarão (*Litopenaeus vannamei*) congelado durante 90 dias de estocagem com valores que variaram de 0,01 a 0,03 mg de malonaldeído / kg de camarão.

O tratamento com revestimento de quitosana pura (Q) apresentou os maiores valores de TBARS em todo o período 180 dias de estocagem. A quitosana é um biopolímero de comprovada ação antioxidante, mas seu efeito antioxidante não foi observado no tratamento com revestimento de quitosana pura (Q) em nosso estudo. Em pesquisa realizada com filé de bonito (*Sarda sarda*) envolto em filme comestível de quitosana conservado sob refrigeração foi observado o mesmo comportamento, pois o tratamento com quitosana também apresentou os maiores valores de TBARS, provavelmente devido ao ácido utilizado na solubilização que pode ter afetado a capacidade antioxidante da quitosana (ALAK, et al., 2010). Pois a condição ácida pode favorecer a peroxidação lipídica pela manutenção do ferro como íon ferroso (LEE; HENDRICKS, 1997). Assim a aplicação de diferentes concentrações de ácido láctico pode influenciar negativamente os valores de TBARS (ARASHISAR; HISAR; YANMK, 2005).

Mas vale salientar que a incorporação dos óleos essenciais cítricos de limão e tangerina aos revestimentos de quitosana teve papel fundamental na capacidade antioxidante dos revestimentos, pois os tratamentos QT e QL apresentaram os menores valores de TBARS de nosso estudo durante o período 180 dias de estocagem, evidenciando a ação antioxidante destes compostos voláteis. Em geral os óleos essenciais provenientes de plantas e frutas apresentam relevante atividade antioxidante (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010). Óleos essenciais derivados de frutas cítricas destacam-se pela potencial atividade antioxidante. Pois as frutas cítricas são caracterizadas como uma excelente fonte de vitaminas C (ácido ascórbico) e compostos fenólicos que possuem considerável atividade antioxidante (PELLEGRINI *et al*, 2007).

Georgantelis *et al.* (2007) relataram que o efeito antioxidativo da quitosana foi acentuado com a incorporação de extrato de alecrim. Ojagh *et al.* (2010) em estudo sobre o efeito de revestimentos de quitosana pura e revestimento de quitosana com óleo essencial de canela na qualidade de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) observaram que as amostras revestidas com quitosana e óleo essencial de canela apresentaram os menores teores de TBA durante estocagem refrigerada, provavelmente devido a um efeito sinérgico do óleo essencial com a quitosana. Analisando amostras de camarão (*Litopenaeus setiferus*) em estocagem congelada Solval *et al.* (2014) constataram a ação antioxidante dos revestimentos de

quitosana, pois as amostras revestidas com quitosana apresentaram menores valores de TBARS que o tratamento sem revestimento e o glaciamento. Em outra pesquisa sobre a ação antioxidante de revestimentos de quitosana em camarão (*Litopenaeus setiferus*) foram observados baixos valores de TBARS (< 1 mg / malonaldeído / kg) em todos os tratamentos durante 120 dias de estocagem congelada, destacando as amostras revestidas com quitosana que apresentaram os menores valores de TBA, ou seja, menor oxidação lipídica (CHOULJENKO *et al.*, 2017).

3.4.4.5 Análises microbiológicas (contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis, *Vibrio* spp., *Staphylococcus coagulase positiva* e coliformes termotolerantes) das amostras de camarão congelado

3.4.4.5.1 Contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis

Os valores referentes à contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis (mesófilas e psicrotróficas) nas amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado (sem cabeça e descascado) submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem estão na Tabela 19 e Figuras 31 e 32. Os valores médios das contagens de bactérias mesófilas e psicrotróficas das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado (sem cabeça e descascado) de acordo com os tratamentos controle (C), glaciamento (G), quitosana (Q), quitosana com óleo essencial de tangerina (QT) e quitosana com óleo essencial de limão (QL) apresentaram distinta variação entre os tratamentos. Enfatizando que os tratamentos (C, G, Q, QT e QL) apresentaram contagens abaixo do limite estabelecido em todo o período de estocagem e uma distinta variação entre o tempo inicial e final de estocagem.

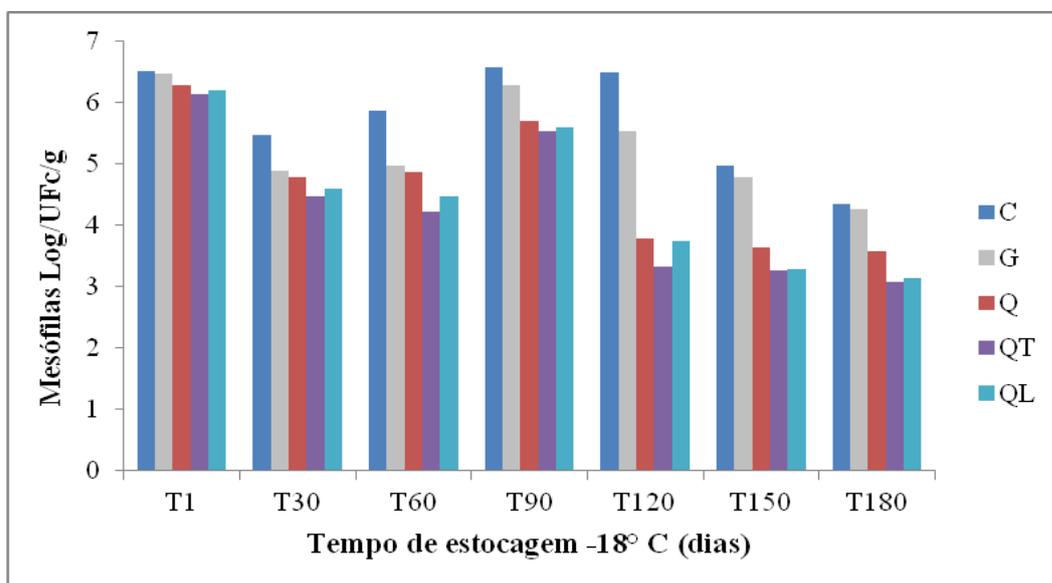
Tabela 19 - Contagem de bactérias mesófilas e psicrotróficas (Log UFC/g) das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.

Tratamentos	Bactérias (Log UFC/g)	Tempo de Estocagem						
		T 1	T 30	T 60	T 90	T 120	T 150	T180
C	Mesofilas	6,51	5,48	5,88	6,59	6,49	4,97	4,36
	Psicrotróficas	6,93	5,13	5,54	6,62	5,93	4,79	4,42
G	Mesofilas	6,48	4,90	4,98	6,29	5,53	4,80	4,26
	Psicrotróficas	6,88	4,55	4,65	6,51	5,89	4,24	4,23
Q	Mesofilas	6,30	4,79	4,88	5,71	3,79	3,65	3,58
	Psicrotróficas	6,81	4,40	4,47	5,93	3,70	2,66	2,51
QT	Mesofilas	6,15	4,48	4,23	5,53	3,33	3,26	3,08
	Psicrotróficas	6,60	4,34	3,65	5,40	3,53	2,43	2,28
QL	Mesofilas	6,20	4,60	4,47	5,60	3,74	3,30	3,15
	Psicrotróficas	6,76	4,36	3,78	5,54	3,65	2,58	2,38

C - Camarão congelado (controle); G - Camarão congelado com glaciamento; Q - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana; QT - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de tangerina; QL - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de limão.

A atual legislação brasileira não estabelece um limite para bactérias heterotróficas cultiváveis, entretanto a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos estabelece o limite máximo de 10^7 UFC/g (equivalente a 7,0 log de UFC/g) para a população destas bactérias em pescados destinados ao consumo humano (ICMSF, 1986). A contagem total de aeróbios mesófilos em placas (*Aerobic Plate Count*) é a metodologia mais utilizada como critério geral das populações bacterianas em alimentos (SILVA *et al.*, 2010). Bactérias psicrotróficas, principalmente as espécies de *Pseudomonas*, produzem lipase e fosfolipase que podem promover um aumento de ácidos graxos livres extremamente vulneráveis à oxidação (KOKA; WEIMER, 2001). Sendo as bactérias psicrotróficas Gram negativas o grupo de micro-organismos determinante da deterioração de pescado estocado em baixas temperaturas (GRAM; HUSS, 1996).

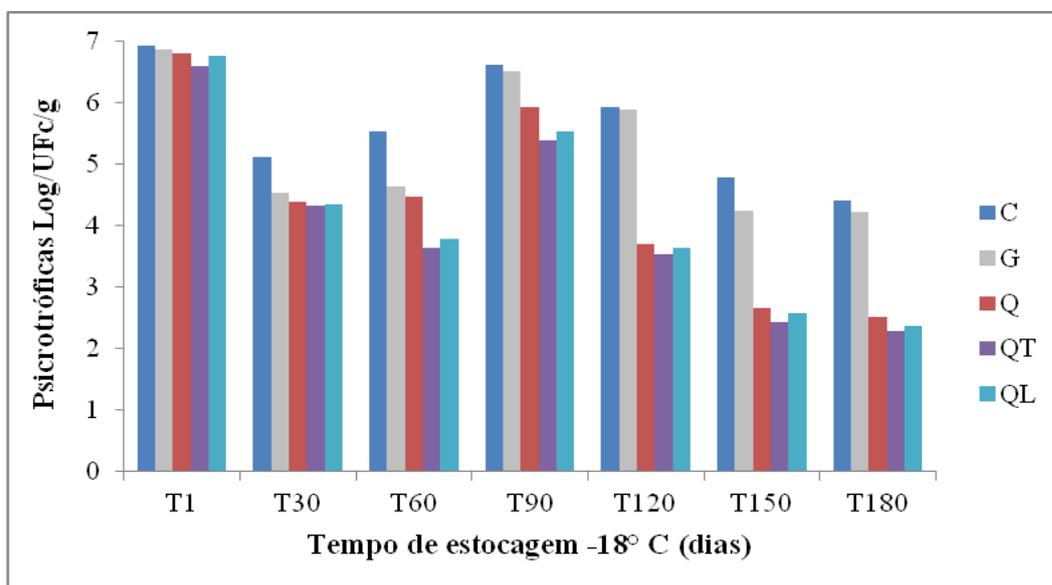
Figura 31 - Contagem de bactérias mesófilas (Log UFC/g) das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.



C - Camarão congelado (controle); G - Camarão congelado com glaciamento; Q - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana; QT - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de tangerina; QL - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de limão.

De acordo com a contagem de bactérias mesófilas os tratamentos C e G inicialmente apresentaram respectivamente os valores de 6,51 e 6,48 Log de UFC/g e a partir de 30 dias de estocagem apresentaram um proeminente descréscimo nos valores. Mas em 60 dias de estocagem apresentaram um leve aumento de valores. Sendo que a partir de 90 dias de estocagem apresentaram um aumento mais acentuado nos valores para em seguida ocorrer um declínio em 120 dias de estocagem. Consolidando o declínio em 150 dias de estocagem até o final de 180 dias de estocagem com valores de 4,36 Log de UFC/g para o tratamento C e 4,26 Log de UFC/g para o tratamento G. No primeiro dia após a estocagem os tratamentos Q, QT e QL apresentaram respectivamente 6,30, 6,15 e 6,20 Log de UFC/g, sendo perceptível um descréscimo a partir de 30 dias de estocagem. A partir de 60 dias de estocagem os tratamentos apresentaram um leve aumento no valor de Q e um pequeno declínio nos valores de QT e QL. Com 90 dias de estocagem os tratamentos Q, QT e QL apresentaram um aumento mais pronunciado para em seguida demonstrar um declínio mais acentuado em 120 dias de estocagem, declínio este que perdurou até o final do período de 180 dias de estocagem apresentando 3,58 Log de UFC/g para o tratamento Q, 3,08 Log de UFC/g para o tratamento QT e 3,15 Log de UFC/g para o tratamento QL.

Figura 32 – Contagem de bactérias psicrotróficas (Log UFC/g) das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.



C - Camarão congelado (controle); G - Camarão congelado com glaciamento; Q - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana; QT - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de tangerina; QL - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de limão.

Segundo a contagem de bactérias psicrotróficas no primeiro dia após a estocagem os tratamentos C e G apresentaram respectivamente 6,93 e 6,88 Log de UFC/g. Em 30 dias de estocagem apresentaram um acentuado decréscimo nos valores, para em seguida apresentarem um acréscimo nos valores em 60 dias de estocagem. A partir de 90 dias de estocagem foi possível observar um aumento mais acentuado nos valores para em seguida ocorrer uma queda brusca nos valores em 120 dias de estocagem. Permanecendo em declínio até o final de 180 dias de estocagem com valores de 4,42 Log de UFC/g para o tratamento C e 4,23 Log de UFC/g para o tratamento G. Inicialmente os tratamentos Q, QT e QL apresentaram respectivamente os valores de 6,81, 6,60 e 6,76 Log de UFC/g, apresentando um decréscimo acentuado nos valores a partir de 30 dias de estocagem. Em 60 dias de estocagem o tratamento Q apresentou um leve aumento nos valores e os tratamentos QT e QL apresentaram uma diminuição nos valores. Em seguida foi observado um considerável aumento em 90 dias de estocagem para Q, QT e QL. A partir de 120 dias de estocagem foi possível observar um consolidado declínio nos tratamentos Q, QT e QL que permaneceu até o final do período de 180 dias de estocagem apresentando respectivamente valores de 2,51, 2,28 e 2,38 Log de UFC/g.

As contagens de bactérias mesófilas e psicrotróficas demonstraram um comportamento similar nos períodos de 1, 30, 90 e 120 dias de estocagem. Mas em 60 dias de estocagem os tratamentos com quitosana e óleos essenciais (QT e QL) registraram contagens de bactérias psicrotróficas bem menores que as mesófilas. Também em 150 e 180 dias de estocagem os tratamentos com quitosana e óleos essenciais (Q, QT e QL) apresentaram contagens de psicrotróficas bem menores que as mesófilas. Durante o período de estocagem foi constatado que os tratamentos C e G apresentaram as maiores contagens para bactérias mesófilas e psicrotróficas e conseqüentemente os tratamentos com quitosana e óleos essenciais (Q, QT e QL) apresentaram as menores contagens para ambas, demonstrando o provável efeito antimicrobiano da quitosana e dos óleos essenciais com a redução das contagens ao longo da estocagem.

Varios estudos demonstraram a eficácia da ação antibacteriana de revestimentos de quitosana em camarão estocado em gelo, refrigerado ou congelado (HUANG; CHEN; QIU; LI, 2012; WANG *et al.*, 2015; CHOULJENKO *et al.*, 2017; YUAN; ZHANG; TANG; SUN, 2016). Em amostras de camarão (*Litopenaeus setiferus*) os tratamentos aplicados apresentaram redução da contagem bacteriana (mesófila) conforme o aumento do período de estocagem e as amostras revestidas com quitosana registraram as menores contagens durante 120 dias de estocagem congelada (CHOULJENKO *et al.*, 2017). Farajzadeh *et al.* (2016) observaram que as contagens de bactérias mesófilas e psicrotróficas dos tratamentos controle (sem revestimento) e revestimento quitosana-gelatina em camarão (*Litopenaeus vannamei*) apresentaram comportamento semelhante durante estocagem refrigerada, ressaltando o melhor desempenho das amostras revestidas que apresentaram as menores contagens de bactérias mesófilas e psicrotróficas.

Os grupos amino carregados positivamente provavelmente são os responsáveis pela atividade antimicrobiana da quitosana, pois os mesmos podem interagir com as membranas celulares microbianas carregadas negativamente, levando ao vazamento dos componentes intracelulares dos micro-organismos (FARAJZADEH *et al.*, 2016). Chung *et al.* (2004) relataram que o tipo de micro-organismo (Gram negativo ou Gram positivo) pode interferir na ação antimicrobiana da quitosana. O efeito do pH dos revestimentos de quitosana nos micro-organismos também pode ser considerado, pois a quitosana é solúvel em meio ácido, assim o efeito sinérgico da quitosana com o pH em conjunto é uma explicação plausível para o seu efeito antimicrobiano (ALISHAHI; AIDER, 2012). Além disso, os

revestimentos de quitosana podem atuar como uma barreira para o oxigênio e assim inibir o crescimento de micro-organismos aeróbicos (JEON *et al.*, 2002).

A aplicação de revestimentos de quitosana incorporados com óleos essenciais aos alimentos pode contribuir para a ampliação de sua vida de prateleira (YUAN; CHEN; LI, 2016). Os revestimentos de quitosana e carvacrol aplicados em camarão (*Litopenaeus vannamei*) reduziram a contagem total de bactérias durante estocagem, ressaltando que a adição de carvacrol ao revestimento de quitosana aumentou o seu efeito antimicrobiano reduzindo ainda mais as contagens bacterianas (WANG *et al.*, 2018). A atividade antimicrobiana de óleos essenciais cítricos foi demonstrada por diversos estudos (ARRUDA *et al.*, 2009; GUERRA *et al.*, 2013; GÜRSOY; TEPE; SOKMEN, 2010; RANDAZZO *et al.*, 2016). He e Xiao (2016) demonstraram a ação inibitória do óleo essencial de tangerina adicionado ao glaciamento de carpa (*Megalobrama amblycephala*), pois as amostras que tiveram óleo essencial de tangerina adicionado ao glaciamento apresentaram as menores contagens bacterianas durante o período de estocagem. Efeitos antimicrobianos aditivos ou sinérgicos podem ser identificados com a associação de revestimentos de quitosana e óleos essenciais (YUAN; CHEN; LI, 2016). O revestimento de quitosana incorporado com óleo essencial de canela exerceu um maior efeito inibitório na contagem total viável de bactérias (mesófilas) e na contagem de bactérias psicrotóxicas em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) refrigerada que o revestimento de quitosana pura (OJAGH *et al.*, 2010).

3.4.4.5.2 Análises de *Vibrio* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes em amostras de camarão congelado

As análises de *Vibrio* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes em amostras de camarão *Litopenaeus vannamei* congelado (sem cabeça e descascado) submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem podem ser observadas na Tabela 20.

Tabela 20 – Análises de *Vibrio* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.

Tempo	Tratamento	<i>Vibrio</i> spp. (NMP/g)	<i>Staphylococcus</i> C + (UFC/g)	<i>C.Termotolerantes</i> (NMP/g)
T 1	C	4,3 x 10	-	4,6 x 10 ²
	G	9,2 x 10	2 x 10 ²	2,1 x 10 ²
	Q	2,1 x 10	-	1,5 x 10
	QT	-	-	1,5 x 10
	QL	9,3 x 10	-	1,5 x 10
T 30	C	-	4 x 10 ³	9,3 x 10 ²
	G	-	3 x 10 ³	4,3 x 10 ²
	Q	-	-	< 3
	QT	-	-	< 3
	QL	-	-	< 3
T 60	C	-	3 x 10 ³	4,3 x 10 ²
	G	-	-	2,1 x 10 ²
	Q	-	-	< 3
	QT	-	-	< 3
	QL	-	-	< 3
T 90	C	-	-	9,3 x 10
	G	-	3 x 10 ³	2,1x10 ²
	Q	-	-	< 3
	QT	-	-	< 3
	QL	-	-	< 3
T 120	C	1,5 x 10 ²	-	2,4 x 10 ²
	G	-	-	2,1 x 10 ²
	Q	-	-	< 3
	QT	-	-	< 3
	QL	9,3 x 10	-	< 3
T 150	C	9,2 x 10	-	4,6 x 10 ²
	G	4,3 x 10	-	7,5 x 10
	Q	1,5 x 10	-	< 3
	QT	-	-	< 3
	QL	-	-	< 3
T 180	C	-	-	7,5 x 10
	G	-	-	1,5 x 10
	Q	-	-	< 3
	QT	-	-	< 3
	QL	-	-	< 3

Staphylococcus C + - *Staphylococcus coagulase positiva*; C. Termotolerantes – Coliformes Termotolerantes; - ausente; C - Camarão congelado (controle); G - Camarão congelado com glaciamento; Q - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana; QT - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de tangerina; QL - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de limão.

Bactérias do gênero *Vibrio* geralmente habitam ambientes aquáticos (marinhos e estuarinos) e estão amplamente associadas ao cultivo de camarões marinhos. Em relação à pesquisa de *Vibrio* spp. foi detectada a sua presença em baixas contagens no primeiro dia após a estocagem em amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* submetidas aos tratamentos controle (C), glaciamento (G), quitosana (Q) e quitosana com óleo essencial de limão (QL) com as contagens respectivamente de $4,3 \times 10$, $9,2 \times 10$, $2,1 \times 10$ e $9,3 \times 10$ NMP/g. Nos períodos de estocagem de 30, 60 e 90 dias não foi detectada a presença de *Vibrio* spp. em todos os tratamentos (C, G, Q, QT e QL). Em 120 dias de estocagem foi detectada a presença de *Vibrio* spp. nos tratamentos C e QL com contagens respectivamente de $1,5 \times 10^2$ e $9,3 \times 10$. No período de 150 dias de estocagem foi detectada a presença de *Vibrio* spp. em baixas contagens nos tratamentos C, G e Q respectivamente $9,2 \times 10$, $4,3 \times 10$ e $1,5 \times 10$. De acordo com as contagens registradas observamos que os tratamentos que evidenciaram a presença de *Vibrio* spp. (C, G, Q e QL) apresentaram valores abaixo do limite permitido pela legislação brasileira vigente para *Vibrio parahaemolyticus* em produtos a base de pescado e similares crus que é de 10^3 (BRASIL, 2001). No período de 180 dias de estocagem foi constatada a ausência de *Vibrio* spp. em todos os tratamentos (C, G, Q, QT e QL). Ressaltando as amostras revestidas com quitosana e óleo essencial de tangerina (QT) que apresentaram ausência de *Vibrio* spp. durante os 180 dias de estocagem.

As bactérias do gênero *Vibrio* são habitualmente isoladas em peixes, moluscos e crustáceos (TALL *et al.*, 2013; MESSELHÄUSSER *et al.*, 2010). Sendo continuamente vinculadas às enfermidades humanas associadas ao consumo de alimentos e águas contaminadas, em destaque as espécies *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, e *Vibrio cholerae* como grandes causadores dessas enfermidades (SILVA *et al.*, 2010). Pesquisa recente com amostras de camarão (*Penaeus vanammei*) evidenciou a ação antimicrobiana da quitosana em *Vibrio parahaemolyticus*, pois o crescimento do mesmo foi inibido pelos revestimentos de oligossacarídeos de quitosana, comportamento este constatado pelo menor crescimento bacteriano das amostras revestidas com quitosana (SUN *et al.*, 2017).

O *Staphylococcus aureus* tem como reservatório os seres humanos e os animais de sangue quente, sendo encontrado nas vias nasais, garganta, pele e cabelos de 50% ou mais de indivíduos humanos saudáveis (SILVA *et al.*, 2010). Este micro-organismo tem como principal fonte de contaminação às condições precárias de manipulação e não é classificado como bom competidor frente a outras bactérias, no entanto, pode ser detectado em pescado em contagens acima do limite permitido pela legislação vigente (SILVA *et al.*, 2008).

De acordo com a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* foi possível observar que apenas os tratamentos controle (C) e congelamento (G) evidenciaram a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva durante a estocagem. No primeiro dia após a estocagem o tratamento G apresentou a contagem de 2×10^2 UFC/g. Em 30 dias de estocagem os tratamentos C e G apresentaram respectivamente contagens de 4×10^3 e 3×10^3 UFC/g. Sendo observado em 60 dias de estocagem que apenas o tratamento C apresentou contagem de 3×10^3 UFC/g, e ao final de 90 dias de estocagem o tratamento G apresentou contagem de 3×10^3 UFC/g. A legislação brasileira vigente estipula que o limite máximo para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em crustáceos *in natura*, refrigerados ou congelados não consumidos crus é de 10^3 (BRASIL, 2001). Assim de acordo com a legislação brasileira foi possível observar que o tratamento C apresentou contagens acima do limite permitido nos períodos de 30 e 60 dias de estocagem e o tratamento G apresentou contagens acima do limite permitido nos períodos de 30 e 90 dias de estocagem. Os tratamentos de quitosana (Q), quitosana com óleo essencial de limão (QL) e quitosana com óleo essencial de tangerina (QT) apresentaram ausência de *Staphylococcus* coagulase positiva em toda a estocagem de 180 dias. Evidenciando, portanto, a eficácia dos revestimentos de quitosana e óleos essenciais para *Staphylococcus* coagulase positiva, pois as amostras revestidas (Q, QT e QL) apresentaram ausência nas contagens durante os 180 dias de estocagem.

O grupo dos coliformes termotolerantes é um subgrupo dos coliformes totais exclusivo aos membros capazes de fermentar lactose de 24 a 48 horas a $\pm 45^\circ$ C, possuindo como habitat natural o trato intestinal de animais de sangue quente (SILVA *et al.*, 2010). Os coliformes termotolerantes nas amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* submetidos aos tratamentos controle (C) e congelamento (G) apresentaram comportamento semelhante nos períodos de 1, 30 e 60 dias de estocagem com valores acima de 10^2 NMP/g. Em 90 dias de estocagem os tratamentos C e G apresentaram comportamento diverso com valores respectivamente de $9,3 \times 10$ e $2,1 \times 10^2$ NMP/g. Foi possível observar novamente um comportamento similar para os tratamentos C e G no período de 120 dias de estocagem com valores acima de 10^2 NMP/g. No período de 150 dias de estocagem os tratamentos C e G apresentaram valores distintos com valores respectivamente de $4,6 \times 10^2$ e $7,5 \times 10$ NMP/g. E ao final da estocagem de 180 dias os tratamentos C e G apresentaram valores próximos e abaixo da legislação vigente com $7,5 \times 10$ NMP/g para o tratamento C e $1,5 \times 10$ NMP/g para o tratamento G. Os tratamentos de quitosana (Q), quitosana com óleo essencial de limão (QL)

e quitosana com óleo essencial de tangerina (QT) apresentaram baixo crescimento no primeiro dia após a estocagem com contagem de $1,5 \times 10$ e não registraram crescimento (< 3 NMP/g) para coliformes termotolerantes a partir do período de 30 dias até o final da estocagem de 180 dias. Sendo possível assim ressaltar a ação antimicrobiana dos revestimentos principalmente a partir de 30 dias de estocagem nos coliformes termotolerantes, pois em todos os tratamentos com revestimentos de quitosana (Q, QT e QL), não ocorreu o crescimento deste micro-organismo deste período até o final de 180 dias de estocagem. O limite máximo estipulado pela legislação brasileira vigente para coliformes termotolerantes é de 10^2 em crustáceos refrigerados ou congelados (BRASIL, 2001). Assim percebeu-se que o tratamento C apresentou valores acima do limite estabelecido pela legislação brasileira nos períodos de 1, 30, 60, 120 e 150 dias de estocagem e o tratamento G apresentou valores acima do limite da legislação nos períodos de 1, 30, 60, 90 e 120 dias de estocagem. Salientando o comportamento das amostras revestidas com quitosana e óleos essenciais (Q, QT e QL) que apresentaram valores abaixo do limite permitido pela legislação vigente durante os 180 dias de estocagem.

Os coliformes termotolerantes podem ser apontados como micro-organismos precursores de qualidade, devido a sua presença estar relacionada habitualmente com bactérias patogênicas (RALL *et al.*, 2008). A bactéria *Escherichia coli* é o parâmetro de contaminação fecal mais usualmente utilizado e está inserida no grupo de coliformes termotolerantes (BARROS *et al.*, 2015). Bactérias do gênero *Staphylococcus* em altas concentrações em alimentos constituem risco à saúde humana, em virtude do seu potencial toxigênico (SILVA-JUNIOR *et al.*, 2015). Diversos estudos validaram a ação antimicrobiana da quitosana em bactérias Gram positivas e Gram negativas, mas também ressaltaram os efeitos bactericidas mais intensos em bactérias Gram positivas (VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017; NO *et al.*, 2002). Sun *et al.* (2012) demonstraram a ação antimicrobiana de oligossacarídeos de quitosana em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, ressaltando que a atividade antimicrobiana foi mais acentuada em *S. aureus* do que em *E. coli*. A incorporação de óleos essenciais aos revestimentos comestíveis de quitosana pode intensificar a ação antimicrobiana da quitosana (PERDONES *et al.*, 2016). O óleo essencial de limão apresenta potencial atividade antimicrobiana (PRABUSEENIVASAN; JAYAKUMAR; IGNACIMUTHU, 2006; RANDAZZO, *et al.*, 2016). E o óleo essencial da casca de tangerina destaca-se pelo promissor potencial antimicrobiano em amostras de carpa (*Megalobrama amblycephala*) (HE; XIAO, 2016).

3.5 Conclusões

As amostras de camarão (*L. vannamei*) do tratamento controle (C) apresentaram valores crescentes de perda de peso durante os 180 dias de estocagem. Em relação às perdas de revestimentos e glaciamento, foi constatado que todas as amostras revestidas com quitosana (Q, QT e QL) apresentaram taxas de perda bem inferiores ao glaciamento (G) durante os 180 dias de estocagem.

A composição química de todos os tratamentos apresentou satisfatória qualidade nutricional, principalmente devido ao baixo teor de lipídios e alto teor de proteínas. Sendo possível observar um pequeno decréscimo nos teores de umidade e proteínas e um acréscimo nos valores de cinzas, lipídios e carboidratos entre o primeiro dia após estocagem e o final do período de 180 dias de estocagem.

Os valores de pH, N-BVT e N-TMA das amostras de camarões (*L. vannamei*) de todos os tratamentos mostraram-se abaixo da legislação vigente, evidenciando o excelente estado de frescor das amostras analisadas durante o período de estocagem de 180 dias. Ressaltando os tratamentos com revestimentos de quitosana (Q, QT e QL) que apresentaram os melhores valores em termos de frescor. Todos os tratamentos apresentaram baixos teores de TBARS, destacando os tratamentos com revestimentos de quitosana adicionados de óleos essenciais de limão e tangerina (QT e QL) que representaram os menores valores de TBARS durante os 180 dias de estocagem.

Quanto às análises microbiológicas as amostras de camarão (*L. vannamei*) de todos os tratamentos mantiveram-se dentro dos limites estabelecidos para mesófilas e psicrotólicas. Para *Vibrio* spp. todos os tratamentos mostraram-se abaixo da legislação brasileira vigente (tratamento QT apresentou ausência em todo o período de estocagem). Apenas os tratamentos C e G apresentaram valores acima da legislação brasileira para coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva, pois os tratamentos com revestimentos de quitosana (Q, QT e QL) apresentaram-se dentro da legislação vigente durante todo o período de estocagem, evidenciando a ação positiva (inibição bacteriana) contra estes micro-organismos patogênicos.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M.; REZAEI, M.; FARZI, G. Influence of chitosan/clay functional bionanocomposite activated with rosemary essential oil on the shelf life of fresh silver carp. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 811–818, 2014.
- ABREU, M. G.; FREITAS, M. Q.; JESUS, E. F. O.; SÃO CLEMENTE, S. C.; FRANCO, R. M.; BORGES, A. Caracterização sensorial e análise bacteriológica do peixe-sapo (*Lophius gastrophytus*) refrigerado e irradiado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2. Santa Maria, março/abril. 2008.
- ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 407-426, 2010.
- AFFONSO, R. S.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p. 146-161, 2012.
- AHMED, S.; IKRAM, S. Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing. **Achievements in the Life Sciences**, v. 10, p. 27–37, 2016.
- AKCAN, T.; ESTEVEZ, M.; SERDAROGLU, M. Antioxidant protection of cooked meatballs during frozen storage by whey protein edible films with phytochemicals from *Laurus nobilis* L. and *Salvia officinalis*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p.323-331, 2017.
- ALAK, G.; HISAR, S. A.; HISAR, O.; KABAN, G.; KAYA, M. Microbiological and Chemical Properties of Bonito Fish (*Sarda sarda*) Fillets Packaged with Chitosan Film, Modified Atmosphere and Vacuum. **Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas**. v.16, p.73-80, 2010.
- ALI, A.; NOH, N. M.; MUSTAFA, M. A. Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 3, p. 56–61, 2015.
- ALISHAHI, A.; AIDER, M. Applications of chitosan in the seafood industry and aquaculture: A review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 817–830, 2012.
- ALOTAIBI, S.; TAHERGORABI, R. Development of a sweet potato starch-based coating and its effect on quality attributes of shrimp during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology** v. 88, p. 203–209, 2018.
- ALPARSLAN, Y.; YAPICI, H. H.; METIN, C.; BAYGAR, T.; GÜNLÜ, A.; BAYGAR, T. Quality assessment of shrimps preserved with orange leaf essential oil incorporated gelatin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 72, p. 457-466, 2016.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official Methods of Analysis of the AOAC**. ed. 18. Gaithersburg, M. D, USA. 2005.
- ARANCIBIA, M. Y.; ALEMÁN, A.; CALVO, M. M.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Antimicrobial and antioxidant chitosan solutions enriched with active shrimp (*Litopenaeus vannamei*) waste materials. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 710-717, 2014a.

- ARANCIBIA, M.; GIMENEZ, B.; LOPEZ-CABALLERO, M.; GOMEZ-GUILLEN, M.; MONTERO, P. Release of cinnamon essential oil from polysaccharide bilayer films and its use for microbial growth inhibition in chilled shrimps. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 989-995, 2014b.
- ARANCIBIA, M.Y.; LOPEZ-CABALLERO, M.E.; GOMEZ-GUILLEN, M.C.; MONTERO, P. Chitosan coatings enriched with active shrimp waste for shrimp preservation. **Food Control**, v. 54 p. 259–266, 2015.
- ARASHISAR, S.; HISAR, O.; YANIK, T. The effects of lactic acid on chemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. **Journal of Food Technology**, v. 3, p. 495-497, 2005.
- ARDILA, N.; DAIGLE, F.; HEUZEY, M.-C.; AJJI, A. Antibacterial activity of neatchitosan powder and flakes, **Molecules**, v. 22 p. 100–119, 2017.
- ARRUDA, D. C.; MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; KATZIN, A. M.; ULIANA, S. R. B. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 63, p. 643-649, 2009.
- ASSIS, O. B. G.; BRITO, D.; FORATO, L. A. O uso de biopolímeros como revestimentos comestíveis protetores para conservação de frutas in natura e minimamente processadas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. São Carlos, Embrapa Instrumentação Agropecuária, 23 p. 2009.
- ASSIS, O. B. G.; BRITO, D. Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações. **Brasilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 87-97, abr./jun. 2014.
- ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em Diversas Concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 223-228, 2003.
- ASTM-D-882-91. Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. In: **Annual book of ASTM standards**. Amer. Soc. for Testing & Materials, Philadelphia, PA, 1991.
- ATARÉS, L.; CHIRALT, A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 51–62, 2016.
- AUAD, R. Z.; SILVA, A. D. R. ; GUIMARAES, J. M. ; PINTO, M. M. ; FELIX, L. R. M. P. ; MENDES, P. P. ; MENDES, E. S. . Potencial antimicrobiano do óleo de cravo da Índia (Eugenol) frente às espécies do gênero *Vibrio*. **Higiene Alimentar**, v. 27, p. 2990-2993, 2013.
- BADAWY, M.E.I.; RABEA, E.I. Potential of the biopolymer chitosan with differentmolecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 51 p. 110–117, 2009.
- BAJPAI, V. K.; RAHMAN, A.; KANG, S. C. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica Thunb.* to control food-borne pathogenic and spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 2, p.117-122, 2008.

- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BALAN, V.; VERESTIUC, L. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. **European Polymer Journal**, v. 53, p. 171–188, 2014.
- BARBIERI JUNIOR, R. C.; OSTRENSKY NETO, A. **Camarões marinhos: engorda**. Aprenda Fácil, Viçosa – MG, 2002. 320 p.
- BARROS, D. J.; MARQUES, A. K.; MORAIS, P. B. Avaliação ambiental com base em indicador microbiológico de balneabilidade no município de Palmas-TO. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 2, n. 4, p. 172-177, 2015.
- BEDIAN, L.; VILLALBA-RODRÍGUEZ, A. M.; HERNÁNDEZ-VARGAS, G; PARRA-SALDIVAR, R.; HAFIZ, M.N. Bio-based materials with novel characteristics for tissue engineering applications-A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98 p.837-846, 2017.
- BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n. 15, p.6185-6205, 2008.
- BERIZI, E.; HOSSEINZADEH, S.; SHEKARFOROUSH, S. S.; BARBIERI, G. Microbial, chemical, textural and sensory properties of coated rainbow trout by chitosan combined with pomegranate peel extract during frozen storage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 1004–1013, 2018.
- BEVERLYA, R. L.; JANES, M. E.; PRINYAWIWATKULA, W.; NO, H. K. Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, London, v. 25, p. 534-537, 2008.
- BOONSUMREJ, S.; CHAIWANICH SIRI, S.; TANTRATIAN, S.; SUZUKI, T.; TAKAI, R. Effects of freezing and thawing on the quality changes of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) frozen by air-blast and cryogenic freezing. **Journal of Food Engineering**, n. 80, p. 292-299, 2007.
- BORGES, A.; CONTE-JUNIOR, C. A.; FRANCO, R. M.; FREITAS, M. Q. Quality Index Method (QIM) developed for pacu *Piaractus mesopotamicus* and determination of its shelf life. **Food Research International**, v. 54, p. 311-317, 2013.
- BORN, L. C. **Pesquisa de Estafilococo Coagulase Positiva em camarões comercializados em diferentes apresentações**. 2012.20 p. Especialização em Produção, Tecnologia e Higiene de Origem Animal – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- BOURTOOM, T. Edible films and coatings: characteristics and properties. **International Food Research Journal**, v.15, n.3, p.237–248, 2008.
- BOURTOOM, T.; CHINNAN, M. S. Preparation and properties of rice starch–chitosan blend biodegradable film. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 1633–1641, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA. Brasília, **Circular GA/DIPOA nº 26/2010**. Estabelece o limite máximo de Glaciamento em pescados congelados. Disponível em: <http://www.pescadog9site.xpg.com.br/9b.pdf> Acesso em: 30 nov. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, **Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001**. Disponível http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b, Acesso em: 21 novembro de 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 1.255 de 25 de junho de 1962**. Brasília/DF, 1962.

BRASIL. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA - **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Brasília/DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2017.

BURT, S. A.; DER ZEE, R. V.; KOETS, A. P.; DE GRAAFF, A. M.; VAN KNAPEN, F.; GAASTRA, W.; HENK P. HAAGSMAN, H. P.; VELDHUIZEN, E. J. A. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 4484-4490, 2007.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n.3, p. 223–253, 2004.

BUTLER, B. L.; VERGANO, P. J.; TESTIN, R. F.; BUNN, J. M.; WILES, J. L. Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 5, p. 953–955, 961, 1996.

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015.

CANEVAROLO JR., S.V. **Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 2 ed. São Paulo, Artliber Editora, 2006.

CAROVIĆ-STANKO, K.; ORLIĆ, S.; POLITEO, O.; STRIKIĆ, F.; KOLAK, I.; MILOS, M.; SATOVIĆ, Z. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chemistry**, Easton, v. 119, p.196-201, 2010.

CARVALHO, G. G. C. **Salga e dessalga de peixes: Aspectos químicos, físicos e efeito antioxidante do extrato aquoso de manjeriço (*Ocimum basilicum*)**. 2012. 59 P. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, 2012.

CARVALHO, N. P. B.; SANTOS, A. N. S.; PINHEIRO, E. O.; LEAL, L. R. A. Potencial antioxidante e antimicrobiano de óleos essenciais de especiarias: uma revisão. **Higiene alimentar** v. 30 n. 254-255, p.12-20, 2016.

CASTRO, A. A.; PAGANI, G. D. Secagem e composição química da cabeça de camarão (*Litopenaeus vannamei* Boone) a diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.6, n.2, p.123-129, 2004.

CAVALCANTI, L. B. **Variação das Condições Hidrológicas e da Clorofila *a* Associadas ao Cultivo do Camarão Marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), na Região Estuarina do Rio Paraíba do Norte (Paraíba – Brasil)**. Recife, 2003. 148 p. Tese (Doutorado em Oceanografia) Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

CAZON, P.; VELAZQUEZ, G.; RAMÍREZ, J. A.; VAZQUEZ, M. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 136-148, 2017.

CERQUEIRA, M. A.; LIMA, A. M.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; MOREIRA, R. A.; VICENTE, A. A. Functional polysaccharides as edible coatings for cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1456-1462, 2009.

CHEN, C. H.; LAI, L. S. Mechanical and water vapor barrier properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsoa leaf gum films in the presence of plasticizer. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1584–1595, 2008.

CHERRAT, L.; ESPINA, L.; BAKKALI, M.; GARCÍA-GONZALO, D.; PAGÁN, R.; LAGLAOUI, A. Chemical composition and antioxidant properties of *Laurus nobilis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food Preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 1197–1204, 2014.

CHIEN, R-C.; YEN, M-T.; MAU, J-L. Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crabshells. **Carbohydrate Polymers**, v. 138, p. 259-264, 2016.

CHILLO, S.; FLORES, S.; MASTROMATTEO, M.; CONTE, A.; GERSCHENSON, L.; DEL NOBILE, M. A. Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch – based edible film properties. **Journal of Food Engineering**, v. 88 p. 159–168, 2008.

CHIUMARELLI, M.; HUBINGER, M. D. Evaluation of edible films and coatings formulated with cassava starch, glycerol, carnauba wax and stearic acid. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 38, p. 20-27, 2014.

CHOULJENKO, A.; CHOTIKO, A.; BONILLA, F.; MONCADA, M.; REYES, V.; SATHIVEL, S. Effects of vacuum tumbling with chitosan nanoparticles on the quality characteristics of cryogenically frozen shrimp. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 114-123, 2017.

CHUNG, Y-C.; SU, C-C.; CHEN, Y-P.; JIA, G.; WANG, H-L.; WU, J. C. G.; LIN, J-G. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25 p. 932–936, 2004.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement**. M100-S23. CLSI: Wayne, v. 33, n.1, 205 p. 2013.

COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G.P.P. *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v.33, p. 344-9, 2011.

- CONNELL, J. J. **Intrinsic quality - In Control of fish quality**. London, UK: Fishing News Books/Blackwell Science, p. 5-36, 1995.
- CONWAY, E. J.; BYRNE, A. An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances. I the micro-determination of ammonia. **Biochemistry Journal**, v. 27, p. 419-429, 1933.
- CORDEIRO DE AZEREDO, H. M. Edible coatings. In S. Rodrigues & F. A. N. Fernandes (Eds.), **Advances in Fruit Processing Technologies** (p. 345–361). Boca Raton: CRC Press Inc., 2012.
- CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine** v. 4, n.2, p. 90-96, 2014.
- COSTA, W. M. **Efeito da Proteína Vegetal na Qualidade de Água dos Efluentes da Carcinicultura**. 2004. 69f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.
- CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, p. 780-792, 2013.
- CUNHA, A. P.; ROQUE, O.R.; NOGUEIRA, M.T. **Plantas aromáticas e óleos essenciais, composição e aplicações**. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal, 2012.
- DAMASCENO, M. S. P. **Efeito do cozimento associado ao aditivo fosfato no rendimento e qualidade físico-química do camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) descascado**. 2017. 74 f. Dissertação (Pós-Graduação em Nutrição) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017.
- DASH, M.; CHIELLINI F.; OTTENBRITE R.M.; CHIELLINI E. Chitosan--A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011.
- DEGHANI, S.; HOSSEINI, S. V.; REGENSTEIN, J. M. Edible films and coatings in seafood preservation: A review. **Food Chemistry**, v.240, p. 505–513, 2018.
- DEVLIEGHIERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, v. 21, p. 703–714, 2004.
- DI PASQUA, R.; HOSKINS, N.; BETTS, G.; MAURIELLO, G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, p. 2745-2749, 2006.
- DOWNES, F. P.; ITO K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington – DC: APHA, 4 ed, 676 p, 2001.
- DUSAN, F.; MARÍAN, S.; KATARÍNA, D.; DOBROSLAVA, B. Essential oils – their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. **Toxicology in Vitro**, n. 20, v.1435–1445, 2006.

- DUTTA, P. K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1173–1182, 2009.
- DU, W.X.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; HUA, S.S.T.; McHUGH, T.H. Antimicrobial volatile essential oils in edible films for food safety. **In Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, p. 1124-1134, 2011.
- ELSABEE, M.Z., ABDU, E.S. Chitosan based edible films and coatings: a review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33 n.4, p.1819–1841, 2013.
- EL, S. N.; KARAGOZLU, N.; KARAKAYA, S.; SAHIN, S. Antioxidant and Antimicrobial activities of essential oils extracted from *Laurus nobilis* L. Leaves by using solvent-free microwave and hydrodistillation. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 97-106, 2014.
- ESCAMILLA-GARCIA, M.; CALDERON-DOMINGUEZ, G.; CHANONA-PEREZ, J. J.; FARRERA-REBOLLO, R.R.; ANDRACA-ADAME, J. A.; ARZATE-VAZQUEZ, I.; MENDEZ-MENDEZ, J.V.; MORENO-RUIZ, L. A. Physical and structural characterisation of zein and chitosan edible films using nanotechnology tools. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 61, p. 196– 203, 2013.
- ESPINA, L.; SOMOLINOS, M.; LORÁN, S.; CONCHELLO, P.; GARCÍA, D.; PAGÁN, R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control**, v. 22, p. 896-902, 2011.
- FALGUERA, V.; QUINTERO, J. P.; JIMENEZ, A.; MUNOZ, J. A.; IBARZ, A. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 292-303, 2011.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all**. Rome. 200 p.
- FARAJZADEH, F.; MOTAMEDZADEGAN, A.; SHAHIDI, S-A.; HAMZEH, S. The effect of chitosan-gelatin coating on the quality of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under refrigerated condition. **Food Control**, v. 67, p. 163-170, 2016.
- FERNANDES, A. P. S. **Avaliação e caracterização das propriedades filmogênicas de proteínas do soro de leite submetidas à irradiação e modificação de pH**. 2014. 99 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Escola de Agronomia - Universidade Federal de Goiás, 2014.
- FERNÁNDEZ CERVERA, M.; KARJALAINEN, M.; AIRAKSINEN, S.; RANTANEN, J.; KROGARS, K.; HEINAMAKI, J.; IRAIZOZ COLARTE, A.; YLIRUUSI, J. Physical stability and moisture sorption of aqueous chitosan–amylose starch films plasticized with polyols. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 69-76, 2004.
- FERNÁNDEZ-PAN, I.; MATÉ, J. I.; GARDRAT, C.; COMA, V. Effect of chitosan molecular weight on the antimicrobial activity and release rate of carvacrol-enriched films. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 60–68, 2015.

FERNANDEZ-SAIZ, P., LAGARON, J.M., OCIO, M.J. Optimization of the biocid properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p.913–921, 2009.

FERREIRA, A. H. **Efeito da adição de surfactantes e do ajuste de pH sobre filmes a base de gelatina, triacetina, ácidos graxos e cera de carnaúba e de cana de açúcar**. 2006. 184 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

FONTES, M. C.; ESTEVES, A.; CALDEIRA, F.; SARAIVA, C.; VIEIRA-PINTO, M.; MARTINS C. Estado de frescor e qualidade higiênica do pescado vendido numa cidade do interior de Portugal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1308-1315, 2007.

FRÁGUAS, R. M.; FARIA, P. V.; QUEIROZ, E. R.; OLIVEIRA, E. N. JR.; ABREU, C. M. P. Preparo e caracterização de filmes comestíveis de quitosana. **Polímeros**, v. 25, p. 48-53, 2015.

FU, X.; SHEN, Y.; JIANG, X., HUANG, D.; YAN, Y. Chitosan derivatives with dual-antibacterial functional groups for antimicrobial finishing of cotton fabrics. **Carbohydrate Polymers**, v. 85 p. 221–227, 2011.

GALVÃO, J.A.; OETTERER, M. **Qualidade e Processamento do Pescado**. Elsevier Editora: Rio de Janeiro, 237p. 2014.

GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 6, p. 941-947, 2000.

GEORGANTELIS, D.; AMBROSIADIS, I.; KATIKOU, P.; BLEKAS, G.; GEORGAKIS, S. A. Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. **Meat Science**, v. 76, p. 172–181, 2007.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2008. 986p.

GHABRAIE, M.; VU, K. D.; TATA, L.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. **LWT - Food Science and Technology**, v.66, p. 332-339, 2016.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ, A.L.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; MONTERO, P. Biodegradable gelatine 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.

GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: Editora Atheneu, 2011, v. 1, 608p.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J-L. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 57, p.190-199, 1992.

- GOSWAMI, T. K.; RAVINDRA, M. R.; NAYAK, T. K. Time-temperature relationships for iqf shrimp with liquid nitrogen and its quality assessment. **Journal of Food Process Engineering**, v. 24, n. 2, p. 71-85, 2001.
- GRAM, L.; HUSS, H. H. Microbiological spoilage of fish and fish products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 121-137, 1996.
- GUERRA, F. Q. S.; MENDES, J. M.; OLIVEIRA, W.A.; SOUZA, F. S.; COUTINHO, H. D. M.; LIMA, E. O. Antibacterial activity of the essential oil of *Citrus limon* against multidrug resistant Acinetobacter strains. **Revista Brasileira de Farmácia / Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 94, p. 142-147, 2013.
- GUILLARD, V.; BROYART, B.; BONAZZI, C.; GUILBERT, S.; GONTARD, N. Preventing moisture transfer in a composite food using edible films: experimental and mathematical study. **Journal of Food Science**. v. 68, n. 7, p. 2267–2277, 2003.
- GÜRISOY, N.; TEPE, B.; SOKMEN, M. Evaluation of the chemical composition and antioxidant activity of the peel oil of *Citrus nobilis*. **International Journal of Food Properties**, v. 13, p. 983-991, 2010.
- GUTIÉRREZ, L.; SÁNCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERÍN, C. New antimicrobial active package for bakery products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 92-99, 2009.
- GUZEY, D.; MCCLEMENTS, D.J. Characterization of β -lactoglobulin-chitosan interactions in aqueous solutions: a calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. **Food Hydrocolloids**, v.20, p.124–131, 2006.
- HAFSA, J.; SMACH, M. A.; BEN KHEDHER, M. R.; CHARFEDDINE, B.; LIMEM, K.; MAJDOUB, H.; ROUATBI, S. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 356–364, 2016.
- HAMED, I.; OZOGUL, F.; REGENSTEIN, J. M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p.40-50, 2016.
- HE, Q.; XIAO, K. The effects of tangerine peel (*Citri reticulatae pericarpium*) essential oils as glazing layer on freshness preservation of bream (*Megalobrama amblycephala*) during superchilling storage. **Food Control**, v. 69, p. 339-345, 2016.
- HOLAPPA, J.; HJÁLMARSDÓTTIR, M.; MÁSSON, M.; RÚNARSSON, O.; ASPLUND, T.; SOININEN, P.; NEVALAINEN, T.; JÄRVINEN, T. Antimicrobial activity of chitosan N-betainates. **Carbohydrate Polymers**, v. 65 p. 114–118, 2006.
- HO, S. C.; KUO, C. T. Hesperidin, nobiletin, and tangeretin are collectively responsible for the anti-neuroinflammatory capacity of tangerine peel (*Citri reticulatae pericarpium*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 71, p. 176-182, 2014.
- HOSSEINI, M.H, RAZAVI, S.H; MOUSAVI, M.A. Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2009. v. 33, p. 727-743, 2009.

HOSSEINNEJAD, M.; JAFARI, S. M. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 467–475, 2016.

HOWGATE, P. A critical review of total volatile bases and trimethylamine as indices of freshness of fish. Part 2. Formation of the bases, and application in quality assurance. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**. v. 9, n. 1, p. 58–88, 2010.

HUANG, J.; CHEN, Q. C.; QIU, M.; LI, S. Q. Chitosan-based edible coatings for quality preservation of postharvest whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of food Science**, v. 77, n. 4, p. C491- C496, 2012.

HUANG, J.; CHEN, W-W.; HU, S.; GONG, J-Y.; LAI, H.W.; LIU, P.; MEI, L-H.; MAO, J-W. Biochemical activities of 6-carboxy β -chitin derived from squid pens. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 191–197, 2013.

HUIDOBRO, A.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MENDES, R. Onboard processing of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) with liquid ice: Effect on quality. **European Food Research and Technology**, v. 214, p. 469–475, 2002.

HUNTERLAB. **CIE L*a*b* color scale: applications note**, v.8, n.7, 1996.
<http://www.hunterlab.com/color_theory.php>, Acesso em 11 de dezembro de 2017.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; SHERAZI, S. T. H.; PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v.108, p.986-995, 2008.

ISCAN, G.; KIRIMER, N.; KURKCUOGLU.; DEMIURCI, F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.14, p.3943-6, 2002.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (1986) **Micro-organisms in foods 2. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications**. University of Toronto Press, Toronto.

JACOBSEN, S.; FOSSAN, K. M. Temporal variations in the glaze uptake on individually quick frozen prawns as monitored by the CODEX standard and the enthalpy method. **Journal of Food Engineering**.v. 48, p. 227-233, 2001.

JEON, Y. J.; KAMIL, J. Y. V. A.; SHAHIDI, F. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 18, p. 5167–5178, 2002.

KERCH, G. Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v.46, n. 2, p. 159–166, 2015.

KOKA, R.; WEIMER, B. C. Influence of growth conditions on heat stable phospholipase activity in *Pseudomonas*. **The Journal of Dairy Research** v. 68, p. 109-116, 2001.

KONG, M.; CHEN, X. G.; LIU, C. S.; LIU, C. G.; MENG, X. H.; YU, L. J Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.65, p. 197–202, 2008.

- KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51–63, 2010.
- KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. **Enterobacteriaceae, Coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators**. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (eds.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th ed. Washington: American Public Health Association, Chapter 8, p.69-82, 2001.
- KOUTSOUDAKI, C.; KRSEK, M.; RODGER, A. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. *chia*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, p. 7681-7685, 2005.
- KRISTO, E.; BILIADERIS, C. G.; ZAMPRAKA, A. Water vapour barrier and tensile properties of composite caseinate-pullulan films: biopolymer composition effects and impact of beeswax lamination. **Food Chemistry**, v. 101, p. 753 -764, 2007.
- KULIKOV, S. N.; LISOVSKAYA, S. A.; ZELENIKHIN, P. V.; BEZRODNYKH, E. A. SHAKIROVA, D. R.; BLAGODATSKIKH, I. V.; TIKHONOV, V.E. Antifungal activity of oligochitosans (short chain chitosans) against some *Candida* species and clinical isolates of *Candida albicans*: molecular weight-activity relationship. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 74, p. 169–178, 2014.
- KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; DUBEY, N. K. Chemical composition, antifungal and antiaflatoxic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. **Food and Chemical Toxicology**, v. 6 p. 539– 543, 2010.
- KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46 ,p. 1–27, 2000.
- KUNICKA-STYCZYN, A.; SIKORA, M.; KALEMBA. D. Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. **Journal of Applied Microbiology**. n. 107, p. 1903–1911. 2009.
- KUREK, M.; GALUS, S.; DEBEAUFORT, F. Surface, mechanical and barrier properties of bio-based composite films based on chitosan and whey protein. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 1, n. 1, p. 56–67, 2014.
- KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers of marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 8, p. 203-226, 2006.
- LACETA, I.; GUERRERO, P.; CABEZUDO, S.; DE LA CABA, K.. Environmental assessment of chitosan-based films. **Journal of Cleaner Production**, v. 41, p. 312-318, 2013.
- LAMIM, R.; FREITAS, R. A.; RUDEK, E. I.; WILHELM, H. M.; CAVALCANTI, O. A.; BRESOLIN, T. M. B. Films of chitosan and N-carboxymethylchitosan. Part II: effect of plasticizers on their physicochemical properties. **Polymer International**, v. 55, n. 8, p. 970 – 977, 2006.
- LAOHAKUNJIT N.; NOOMHORN, A. Effect of plasticizer on mechanical and barrier properties of rice starch film. **Starch/Starke**, v. 56, p. 348–356, 2004.

- LAROTONDA, F. D.; MATSUI, K. N.; SOBRAL, P. J. A.; LAURINDO, J. B. Hygroscopicity and water vapor permeability of Kraft paper impregnated with starch acetate. **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 394-402, 2005.
- LEE, B. J.; HENDRICKS, D. G. Antioxidant effect of L-carnosine on liposomes and beef homogenates. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 5, p. 931-934, 1997.
- LEE, S. J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum L*) and thyme leaves (*Thymus vulgaris L.*) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, p.131-137. 2005.
- LEKJING, S. A chitosan-based coating with or without clove oil extends the shelf life of cooked pork sausages in refrigerated storage. **Meat Science**, v. 111, p. 192–197, 2016.
- LIMA, A. P. S. **Estrutura genética de populações cultivadas do camarão marinho *litopenaeus vannamei* em Pernambuco**. 2007, 85 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.
- LIM, S.-H.; HUDSON, S.M. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. **Carbohydrate Research**, v. 339 p. 313–319, 2004.
- LIRA, G. M.; SILVA, M. C. D.; SILVA, K. W. B.; PADILHA, B. M.; CAVALCANTI, S. A. T. Q.; OLIVEIRA, K. I. V.; ALBUQUERQUE, A. L. I. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do camarão espigão (*Xiphopenaeus kroyeri*, heller, 1862) in natura e defumado. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 31, n. 1, p. 151-160, jan./jun. 2013.
- LI, S.; ZHANG X.; SUN Z.; LI F.; XIANG J. Transcriptome analysis on Chinese Shrimp *Fenneropenaeus chinensis* during WSSV acute infection. **PLoS One**, v. 8, n. 3, 2013.
- LIU, J.; LIU, S.; WU, Q.; GU, Y.; KAN, J.; JIN, C. Effect of protocatechuic acid incorporation on the physical, mechanical, structural and antioxidant properties of chitosan film. **Food Hydrocolloids** v.73, p. 90-100, 2017.
- LIU, Z.; GE, X.; LU, Y.; DONG, S.; ZHAO, Y.; ZENG, M. Effects of chitosan molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatine-based films. **Food Hydrocolloids** v. 26, p. 311–317, 2012.
- LI, X-F.; FENG, X-Q.; YANG, S.; FU, G-Q.; WANG, T-P.; SU, Z-X. Chitosan kills *Escherichia coli* through damage to be of cell membrane mechanism. **Carbohydrate Polymers**, v. 79 p. 493–499, 2010.
- LI, Z.; YANG, F; YANG, R. Synthesis and characterization of chitosan derivatives with dual-antibacterial functional groups. **International Journal of Biological Macromolecules**, P. 75, v. 378–387, 2015.
- LOREVICE, M. V.; MOURA, M, R.; MATTOSO, L. H. C. Nanocompósito de polpa de mamão e nanopartículas de quitosana para aplicação em embalagens. **Química Nova**, v. 37, n. 6, p. 931-936, 2014.
- LOSADA, V.; PIÑEIRO, C.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; AUBOURG, S. P. Inhibition of chemical changes related to freshness loss during storage of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in slurry ice. **Food Chemistry**, v.93, p.619-625, 2005.

- LU, F.; LIU, D.; YE, X.; WEI, Y.; LIU, F. Alginate-calcium coating incorporating nisin and EDTA maintains the quality of fresh northern snakehead (*Channa argus*) fillets stored at 4° C. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 848-854, 2009.
- MALLE, P.; POUMEYROL, M. A new chemical criterion for the quality control of fish: trimethylamine total / volatile basic nitrogen (%). **Journal of Food Protection**. V. 52, p. 419-423, 1989.
- MALLE, P.; TAO, S. H. Rapid quantitative-determination of trimethylamine using steam distillation. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 9, p. 756-760, 1987.
- MAQBOOL, M.; ALI, A.; ALDERSON, P. G. Effect of cinnamon oil on incidence of anthracnose disease and postharvest quality of bananas during storage. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 12, p. 516-520, 2010.
- MARTELLI, S. M.; MOORE, G.; PAES, S. S.; GANDOLFO, C.; LAURINDO, J. B. Influence of plasticizers on the water sorption isotherms and water vapor permeability of chicken feather keratin films. **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, p. 292-301, 2006.
- MARTINS, A.G.L.A.; NASCIMENTO, A.R.; MOUCHREK FILHO, J.E.; MENDES FILHO, N.E.; SOUZA, A.G.; ARAGÃO, N.E.; SILVA, D.S.V. Atividade antibacteriana do óleo essencial do manjeriço frente a sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatogênica isolados de alfaces. **Ciência Rural**, v.40, n.8, p.1791-1796, 2010.
- MATAK, K.; TAHERGORABI, R.; JACZYNSKI, J. A review: Protein isolates recovered by isoelectric solubilization / precipitation processing from muscle food by-products as a component of nutraceutical foods. **Food Research International**, v. 77, n.4, p. 697 – 703, 2015.
- MAYACHIEW, P.; DEVAHASTIN, S.; MACKKEY, B. M.; NIRANJAN, K. Effects of drying methods and conditions on antimicrobial activity of edible chitosan films enriched with galangal extract. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 125–132, 2010.
- MCHUGH, T. H.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; KROCHTA, J. M. Hydrophilic edible film: Modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 899–903, 1993.
- MCKAY, D. L., BLUMBERG, J. B. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 8, p. 619-33, 2006.
- MERGHNI, A.; MARZOUKI, H.; HENTATI, H.; AOUNI, M.; MASTOURI, M. Antibacterial and antibiofilm activities of *Laurus nobilis* L. essential oil against *Staphylococcus aureus* strains associated with oral infections. **Pathologie Biologie**, v. 64, p. 29–34, 2016.
- MESSELHÄUSSER, U.; COLDITZ, J.; THÄRIGEN, D.; KLEIH, W.; HÖLLER, C.; BUSCH, U. Detection and differentiation of *Vibrio* spp. in seafood and fish samples with cultural and molecular methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, p. 360-364, 2010.

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.

MOHEBI, E.; SHAHBAZI, Y. Application of chitosan and gelatin based active packaging films for peeled shrimp preservation: A novel functional wrapping design. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 108-116, 2017.

MOL, A. S. **Preparação e funcionalização de nano fibras (*whiskers*) de quitina e sua aplicação como agente de recuperação de propriedades em polímeros reciclados**. 2014. 108 f. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2014

MOLES, P., BUNGE, J. **Shrimp farming in Brazil: An industry overview**. Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium. 26 p., 2002.

MOORE, G. R. P.; MARTELLI, S. M.; GANDOLFO, C.; SOBRAL, P. J. A.; LAURINDO, J. B. Influence of the glycerol concentration on some physical properties of feather keratin films. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 975-982, 2006.

MORADI, M; TAJIK, H; ROHANI, S. M. R.; OROMIEHIE, R. A.; MALEKINEJAD, H.; ALIAKBARLU, J.; HADIAN, M. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46 p. 477-484, 2012.

MOUCHEREK FILHO, V.E.; VAZ, M.S.O.; MARANHÃO, S.C. Avaliação organoléptica e análise bromatológica, para fins nutricionais, do camarão, caranguejo e sururu (in natura) consumidos na ilha de São Luís - MA. **Caderno de Pesquisa**, São Luís, v. 14, n. 1, p. 24-34, 2003.

MOUFIDA, S.; MARZOUK, B. Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1283-1289, 2003.

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

MUXIKA, A.; ETXABIDE, A.; URANGA, J.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 105, p. 1358–1368, 2017.

MUZZARELLI, R. A. A.; BOUDRANT, J.; MEYER, D.; MANNO, N.; DEMARCHIS, M.; PAOLETTI, M. G. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: a tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.87, n.2, p. 995-1012, 2012.

NAGAKURA, K. General analysis. In: OKADA, M; HIRAO, S.; NOGUCHI, E.; SUZUKI, T.; YOKOSUKI, M. (Eds.), **Utilization of marine products**, Tokyo, Japan. Overseas Technical Cooperation Agency, p. 159–169, 1972.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v.6, n.12, p.1451-1474, 2013.

NGO, D. H.; VO, T. S.; NGO, D. N.; KANG, K. H.; JE, J. Y.; PHAM, H. N. D.; KIM, S. K. Biological effects of chitosan and its derivatives. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 200–216, 2015.

NO, H. K.; MEYERS, S. P.; PRINYAWIWATKUL, W.; XU, Z. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 5, p. R87–R100, 2007.

NO, H. K.; PARK, N. Y.; LEE, S. H.; MEYERS, S. P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal of Food Microbiology**, v.74, p. 65–72, 2002.

NOWZARI, F.; SHABANPOUR, B.; OJAGH, S. M. Comparison of chitosan-gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. **Food Chemistry**, v.141, n. 3, p. 1667-1672, 2013.

NUNES, M.L.; BATISTA, I.; CARDOSO, C. **Aplicação do Índice de Qualidade (QIM) na avaliação da frescura do pescado**. Lisboa: IPIMAR, 51p., 2007.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual da pesca, ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: Varela, 430 p. 1999.

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.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SALMIÈRE, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial and antioxidant effects of milk-protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5598-5605. 2004.

OZDEMIR, M.; FLOROS, J.D. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 1, p.116-123, 2008.

ÖZYURT, G.; KULEY, E.; ÖZKÜTÜK, S.; ÖZOGUL, K. Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullus barbatus*) and goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice. **Food Chemistry**, v. 114, p. 505-510, 2009.

PARK, S-I.; ZHAO, Y. Incorporation of a High Concentration of Mineral or Vitamin into Chitosan-Based Films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.1933–1939, 2004.

PARK, S. Y.; MARSH, K. S.; RHIM, J. W. Characteristics of Different Molecular Weight Chitosan Films Affected by the Type of Organic Solvents. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 1, p. 194-197, jul. 2002.

PEDROSA, L. F. C.; COZZOLINO, S. M. F. Composição centesimal e de minerais de mariscos crus e cozidos da cidade de Natal/RN. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n.2, p. 154-157, maio/ago. 2001.

PELLEGRINI, N.; COLOMBI, B.; SALVATORE, S.; BRENN, O. V.; GALAVERNA, G.; DEL RIO, D.; BIANCHI, M.; BENNETT, R. N.; BRIGHENT, F. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p.103–111, 2007.

PELLISSARI, F. M. **Produção e caracterização de filmes de amido de mandioca, quitosana e glicerol com incorporação de óleo essencial de orégano**. 2009. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

PENG, L-W.; SHEU, M-J.; LIN, L-Y.; WU, C-T.; CHIANG, H-M.; LIN, W-H.; LEE.; M-C.; CHEN, H-C. Effect of heat treatments on the essential oils of kumquat (*Fortunella margarita* Swingle). **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 532–537, 2013.

PENG, Y.; LI, Y. Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 287-293, 2014.

PERDONES, A.; CHIRALT, A.; VARGAS, M. Properties of film-forming dispersions and films based on chitosan containing basil or thyme essential oil. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 271-279, 2016.

PEREDA, M.; AMICA, G.; MARCOVICH, N. E. Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1318– 1325, 2012.

PEREZ-VELAZQUEZ, M.; ALLEN DAVIS, D.; ROY, L. A.; GONZÁLEZ-FÉLIX, M. L. Effects of water temperature and Na⁺:K⁺ ratio on physiological and production parameters of *Litopenaeus vannamei* reared in low salinity water. **Aquaculture**, v.342-343, p.13-17, 2012.

PINHEIRO, A. C.; CERQUEIRA, M.A.; SOUZA, B. W. S.; MARTINS, J. T.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares. **Boletim de Biotecnologia**, Portugal, p. 19-28, 2010.

POLITEO, O.; JUKIC, M; MILOS, M. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. **Food Chemistry**, v.101, p.379-385, 2007.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 6, p. 1-8, 2006.

PRATEEPCHANACHAI, S.; THAKHIEWB, W.; DEVAHASTINC, S.; SOPONRONNARIT, S. Mechanical properties improvement of chitosan films via the use of plasticizer, charge modifying agent and film solution homogenization. **Carbohydrate Polymers**, v. 174 p. 253–261, 2017.

- QUEIROGA, I. M. B. N.; SILVA, J.A.; CAVALHEIRO, J.M.O.; QUEIROGA, R.C.R.E.; BATISTA, A.S.M.; BARRETO, T.A. Qualidade sensorial do camarão *Litopenaeus vannamei* congelado. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 1801-1812, jul./ ago. 2014.
- RABELLO, M. **Aditivação de Polímeros**. São Paulo: Editora Artliber, p. 141, 2000.
- RALL, V.L.M.; CARDOSO, K.F.G.; XAVIER, C. Enumeração de coliformes termotolerantes em pescados frescos e congelados. **Pubvet**, Londrina, V. 2, N. 39, Art#375, 2008.
- RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes: Fundamentos e Metodologias**. Ed. Ufv, Viçosa, p.599, 2007.
- RANDAZZO, W.; JIMENEZ-BELENGUER, A.; SETTANNI, L.; PERDONES, A.; MOSCHETTI, M.; PALAZZOLO, E.; GUARRASI, V.; VARGAS, M.; GERMANA, M. A.; MOSCHETTI, G. Antilisterial effect of citrus essential oils and their performance in edible film formulations. **Food Control**, v. 59 p. 750-758, 2016.
- RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.
- REDDY, D. N.; AL-RAJAB, A. J.; SHARMA, M.; MOSES, M. M.; REDDY, G. R.; ALBRATTY, M. Chemical constituents, in vitro antibacterial and antifungal activity of *Mentha x piperita* L. (peppermint) essential oils. **Journal of King Saud University – Science**. <<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.07.013>>, 2017.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.
- ROBERTS, G. A. F. **Chitin Chemistry**, Macmillan Press LTda, London v. 14, n. 3, p-166-169, 1992.
- ROCHA, I. P., RODRIGUES, J., AMORIM, L. A Carcinicultura Brasileira em 2003. **Revista da Associação Brasileira dos Criadores de Camarão – ABCC**, v. 6, p. 30–36, 2004.
- ROMANAZZI, G.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; DI VENERE, D.; SALERNO, M. Effect of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 1862–1867, 2002.
- ROTTA, J.; MINATTI, E.; BARRETO, P. L.M. Determination of structural and mechanical properties, diffractometry, and thermal analysis of chitosan and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 450-455, abr.-jun. 2011.
- ROTTA, J. ; OZÓRIO, R. A.; KEHRWALD, A. M.; BARRA, G. M. O.; AMBONI, R. D. M. C.; BARRETO, P. L. M. Parameters of color, transparency, water solubility, wettability and surface free energy of chitosan/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. **Materials Science and Engineering C**, v. 29 p. 619-623, 2009.
- ROTTA, R.B. **Estudo da atividade glutatona peroxidase em carne de frango**. 2007. 79 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim. 2007.

RUIZ-NAVAJAS, Y.; VIUDA-MARTOS, M.; SENDRA, E.; PEREZ-ALVAREZ, J.A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. **Food Control**, v. 30, p. 386-392, 2013.

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

SAGOO, S.; BOARD, R.; ROLLER, S. Chitosan inhibits growth of spoilage microorganisms in chilled pork products. **Food Microbiology**, v. 19, n. 2-3, p. 175-182, 2002.

SALGADO, P. R.; ORTIZ, C. M.; MUSSO, Y. S.; DI GIORGIO, L.; MAURI, A. N. Edible films and coatings containing bioactives. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 86-92, 2015.

SALLAM, K. I. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. **Food Control**, v. p. 566 – 575, 2007.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHAFER, M.; CHIRALT, A.; GONZALEZ-MARTINEZ, C. Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 277–283, 2010.

SÁNCHEZ-ORTEGA, I.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. E.; SANTOS-LÓPEZ, E. M.; AMARO-REYES, A.; BARBOZA-CORONA, J. E.; REGALADO, C. Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. **The Scientific World Journal**, p.1–18, 2014.

SANTOS, C. H. A.; LOURENÇO, J. A.; BAPTISTA, R. B.; IGARASHI, M.A. Crescimento e sobrevivência do camarão-branco do pacífico *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) em diferentes salinidades. **Revista: Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 783-789, jul./set. 2009.

SANTOS, F. M. S.; SILVA, A. I. M.; VIEIRA, C. B.; ARAÚJO, M. H.; SILVA, A. L. C.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; SOUZA, B. W. S.; BEZERRA, R. S. Use of chitosan coating in increasing the shelf life of liquid smoked Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillet. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, p. 1304–1311, 2017.

SANTOS, J. C.; CARVALHO FILHO, C. D.; BARROS, T. F.; GUIMARÃES, A. L. Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. **Semina**, Ciências Agrárias, v. 32, n. 4, p. 1557 – 1564, 2011.

SÃO PEDRO, A.; CABRAL-ALBUQUERQUE, E.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B. Chitosan: An option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care? **Carbohydrate Polymers**, v.76, p.501-508, 2009.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. OLIVEIRA, L. M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R. M. V.; GARCIA, E. E. C. **Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, 267 p. 2002.

- SARTORATOTTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.
- SATHIVEL, S.; LIU, Q.; HUANG, J.; PRINYAWIWATKUL, W. The influence of chitosan glazing on the quality of skinless pink salmon (*Oncorhynchus gorbusha*) fillets during frozen storage. **Journal of Food Engineering**, n.83, p. 366–373, 2007.
- SEDIGH-JASOUR, M.; EHSANI, A.; MEHRYAR, L.; NAGHIBI, S. S. Chitosan coating incorporated with the lactoperoxidase system: an active edible coating for fish preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 1373–1378, 2015.
- SETTANNI, L.; PALAZZOLO, E.; GUARRASI, V.; ALEO, A.; MAMMINA, C.; MOSCHETTI, G.; GERMANÀ, M. A. Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. **Food Control**, v. 26, p. 326-330, 2012.
- SEVERINO, R.; VU, K. D.; DONSI, F.; SALMIERI, S.; FERRARI, G.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of different combined non-thermal treatments against *Listeria monocytogenes* in broccoli florets. **Journal of Food Engineering**, v.124, p.1–10, 2014.
- SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, v. 39, p. 639-644, 2006.
- SHEKARFOROUSH, S.S.; BASIRI, S.; EBRAHIMNEJAD, H.; HOSSEINZADEH, S. Effect of chitosan on spoilage bacteria, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* inured chicken meat. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.76, p.303–309, 2015.
- SHEN, Z.; KAMDEN, D. P. Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 289–296, 2015.
- SHI, W.; DUMONT, M-J. Review: bio-based films from zein, keratin, pea, and rapeseed protein feedstocks. **Journal of Materials Science**, v. 49 p.1915, 2014.
- SHOJAEE-ALIABADI, S.; HOSSEINI, H.; MOHAMMADIFAR, M. A.; MOHAMMADI, A.; GHASEMLOU, M.; HOSSEINI, S. M.; KHAKSAR, R. Characterization of κ -carrageenan films incorporated plant essential oils with improved antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 582-591, 2014.
- SILVA-JÚNIOR, A. C. S.; SILVA, A. S. S.; BRITO, T. P.; FERREIRA, L. R. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes em Jaraqui, *Semaprochilodus brama* (Valenciennes, 1850) comercializado na Feira do Pescado, Macapá-AP. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 5, n. 1, p. 32-36, 2015.
- SILVA, M. L.; MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M. H. Aspectos sanitários da comercialização de pescado em feiras livres da cidade de São Paulo, Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, p. 208-214, 2008.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 624 p, 2010.

SILVA, T. H.; ALVES, A.; FERREIRA, B.M.; OLIVEIRA, J.M.; REYS, L.L.; FERREIRA, R.J.F.; SOUSA, R.A.; SILVA, S.S.; MANO, J.F.; REIS, R.L. Materials of marine origin: a review on polymers and ceramics of biomedical interest. **International Materials Reviews**, v. 57 p. 276–306, 2012.

SILVEIRA, S. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais e óleos essenciais e aplicação do óleo essencial de louro (*L. nobilis*) como agente conservador natural em embutido cárneo frescal**. 2012. 215 f. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2012.

SIMON, J. E.; JAMES Q.; MURRAY, R. M. **Basil: a source of essential oils**. 1990. Disponível em: < <https://hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1990/V1-484.html>>. Acesso em 10 jan. 2018.

SINGH, B., SHARMA, N. Mechanistic implications of plastic degradation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 93, p. 561–584, 2008.

SINGH, R, SHUSHNI, M.A.M., BELKHEIR, A. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, p. 322–328, 2015.

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

SKURTYS, O.; ACEVEDO, C.; PEDRESCHI, F.; ENRONOE, J.; OSORIO, F.; AGUILERA, J. M. **Food Hydrocolloid Edible Films and Coatings**. 2012. Disponível em: <http://intrawww.ing.puc.cl/siding/datos/public_files/profes/fpedreschi_GTSNWOEDCWJO_GDA/Food%20Hydrocolloid%20Edible%20Films%20and%20Coatings.pdf>. Acesso em: 10. jun. 2015.

SOARES, N. M. F.; OLIVEIRA M. S. G.; VICENTE, A. A. Effects of glazing and chitosan-based coating application on frozen salmon preservation during six-month storage in industrial freezing chambers. **LWT – Food Science and Technology**. v. 61, p. 524-531, 2015.

SOARES, V. F. M.; VALE, S. R.; JUNQUEIRA, R. G.; GLORIA, M. B. A. Teores de histamina e qualidade físico-química e sensorial de filé de peixe congelado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 462-470, 1998.

SOKOVIC, M.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. **European Journal of Plant Pathology**, v.116, p.211-224, 2006.

SOLVAL, K. M.; RODEZNO, L. A. E. .; MONCADA, M.; BANKSTON, J. D.; SATHIVEL, S. Evaluation of chitosan nanoparticles as a glazing material for cryogenically frozen shrimp. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, p. 172-180, 2014.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. **Plasticizers in edible films and coatings**. In: **Innovations in Food Packaging** (Han J. H, ed), p. 403-433, Monitoba, Canada, Elsevier Academic Press, 2005.

- SOUZA, B.W.S.; CERQUEIRA, M. A.; CASARIEGO, A.; LIMA, A. M. P.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Effect of moderate electric fields in the permeation properties of chitosan coatings. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2110–2115, 2009.
- SOUZA, B.W.S.; CERQUEIRA, M. A.; RUIZ, H. A.; MARTINS, J. T.; CASARIEGO, A.; TEXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Effect of Chitosan-Based Coatings on the Shelf Life of Salmon (*Salmo salar*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 11456–11462, 2010a.
- SOUZA, B.W.S.; CERQUEIRA, M.A.; TEIXEIRA, J.A.; VICENTE, A.A. The Use of Electric Fields for Edible Coatings and Films Development and Production: A Review. **Food Engineering**, v. 2, p. 244–255, 2010b.
- SOUZA, M. M. M.; FURTUNATO, D. M. N.; CARDOSO, R. C. V.; ARGÔLO, S. V.; SILVA, I. R. C. S.; SANTOS, L. F. P. Avaliação do frescor do pescado congelado comercializado no mercado municipal de São Francisco do Conde-BA. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 359–368, 2013.
- SOUZA, V. G. L.; FERNANDO, A. L.; PIRES, J. R. A.; RODRIGUES, P. F.; LOPES, A. A. S.; FERNANDES, F. M. B. Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants. **Industrial Crops and Products**. v. 107, p. 565–572, 2017.
- SRINIVASA, P. C.; RAMESH, M. N.; THARANATHAN, R. N. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 21, p. 1113–1122, 2007.
- STAMFORD, T. C. M. **Produção, caracterização e atuação anticariogênica da quitosana extraída de *Cunninghamella elegans* UCP 542**. 2006. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Microbiologia) - Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.
- STANSBY, M. E. Proximate Composition of Fish. In: HEEN, E.; KREUZER, R. (Eds.), **Fish in Nutrition**. London: Fishing News, p. 55–60, 1962.
- SUN, L., DU, Y., FAN, L.; CHEN, X.; YANG, J. Preparation, characterization and antimicrobial activity of quaternized carboxymethyl chitosan and application as pulp-cap. **Polymer**, p. 47, v. 1796–1804, 2006.
- SUN, T.; HU, D. M.; XIE, J. Antibacterial activity of chitosan oligosaccharides derivatives produced by Maillard reaction. **Natural Product Research & Development**, v. 24, p. 164–167, 2012.
- SUN, T.; QIN, Y.; XU, H.; XIE, J.; HU, D.; XUE, B.; HUA, X. Antibacterial activities and preservative effect of chitosan oligosaccharide Maillard reaction products on *Penaeus vannamei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 764–768, 2017.
- SUPPAKUL, P.; MILTZ, J.; SONNEVELD, K.; BIGGER, W. Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications, **Journal of Food Science**, v.68, n. 2, p.408–420, 2003a.
- SUPPAKUL P.; MILTZ J.; SONNEVELD K.; BIGGER W. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packing. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p.3197–3207, 2003b.

- TALL, A.; HERVIO-HEATH, D.; TEILLON, A.; BOISSET-HELBERT, C.; DELESMONT, R.; BODILIS, J.; TOURON-BODILI, A. Diversity of *Vibrio* spp. isolated at ambient environmental temperature in the Eastern English Channel as determined by *pyrH* sequencing. **Journal of applied microbiology**, v. 114, p. 1713-1724, 2013.
- TALÓN, E.; TRIFKOVIC, K. T.; NEDOVIC, V. A.; BUGARSKI, B. M.; VARGAS, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1153-1161, 2017.
- TEIXEIRA, B; MARQUES, A; PIRES, C; RAMOS, C; BATISTA, I; SARAIVA, J. A.; NUNES, M. L. Characterization of fish protein films incorporated with essential oils of clove, garlic and origanum: Physical, antioxidant and antibacterial properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 533-539, 2014.
- THARANATHAN, R.N.; KITTUR, F.S. Chitin - the undisputed biomolecule of great potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.43, n.1, p.61-87. 2003.
- TOKURA, S.; UENO, K.; MIYAZAKI, S.; NISHI, N. Molecular weight dependent antimicrobial activity of chitosan. **Macromolecular Symposia**, v. 120, p. 1–9, 1997.
- TOLAIMATE, A.; DESBRIERES, J.; RHAZIA, M.; ALAGUI, A. Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. **Polymer** v. 44, p. 7939–7952, 2003.
- TRIPOLI, E.; GUARDIA, M.L.; GIAMMANCO, S.; MAJO, D.D.; GIAMMANCO, M. Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: a review. **Food Chemistry**, v. 104, v. 2, p. 466–479, 2007.
- TURGIS, M.; VU, K. D.; DUPONT, C.; LACROIX, M. Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. **Food Research International**, v. 48, p. 696-702, 2012.
- VAN DEN BROEK, L. A. M.; KNOOP, R. J. I.; KAPPEN, F. H. J.; BOERIU, C. G. Chitosan films and blends for packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 237–242, 2015.
- VANHAECKE, L.; VERBEKE, W.; BRABANDER, H. F. D. Glazing of frozen fish: Analytical and economic challenges. **Analytica Chimica Acta**. v. 672, p. 40–44, 2010.
- VANNUCCHI, H. **Aplicações das recomendações nutricionais adaptadas à população brasileira**. Ribeirão Preto; Editora Legis Suma Ltda., v.2, 1990.
- VASCONCELOS, M.M.M.; SILVEIRA, V.M.M.A. Rendimento e composição química dos componentes estruturais do camarão branco, *Litopenaeus vannamei*, cultivado no município de Acaraú/CE. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS: ESTRATÉGIA PARA O DESENVOLVIMENTO, **Anais**. Recife. CD ROOM do IXI CBCTA, v. 1. p. 332-332, 2004.
- VEKIARI, S. A.; PROTOPAPADAKIS E. E.; PAPADOPULOU P.; PAPANICOLAOU D.; PANOU, C.; VAMVAKIAS, M. Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a Cretan lemon variety. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 147-153. 2002.

VERLEE, A.; MINCKE, S.; STEVENS, C. V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 268–283, 2017.

VICENTINI, N. M. **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita**. 2003. 198 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

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

WANG, Q.; LEI, J.; MA, J.; YUAN, G.; SUN, H. Effect of chitosan-carvacrol coating on the quality of Pacific white shrimp during iced storage as affected by caprylic acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.106, p. 123–129, 2018.

WANG, L. N.; LIU, F.; JIANG, Y. F.; CHAI, Z.; LI, P. L.; CHENG, Y. Q; LENG, X. Synergistic antimicrobial activities of natural essential oils with chitosan films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 23, p. 12411–12419, 2011.

WANG, Y.; LIU, L.; ZHOU, J.; RUAN, X.; LIN, J.; FU, L. Effect of chitosan nanoparticle coatings on the quality changes of postharvest whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, during storage at 4° C. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, p. 907-915, 2015.

WANNISSORN, B.; JARIKASEM, S.; SIRIWANGCHAI, T.; THUBTHIMTHED, S. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. **Fitoterapia**, v.76, p.233-236, 2005.

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

WU, Y.; RHIM, J. W.; WELLER, C. L.; HAMOUZ, F.; CUPPETT, S.; SCHNEPF, M. Moisture loss and lipid oxidation for precooked beef patties stored in edible coatings and films. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 2, p. 300-304, 2000.

XIAO, B.; WAN, Y.; ZHAO, M.; LIU, Y.; ZHANG, S. Preparation and characterization of antimicrobial chitosan-N-arginine with different degrees of substitution. **Carbohydrate Polymers**, v. 83 p. 144–150, 2011.

YASSORALIPOUR, A.; BAKAR, J.; ABDUL RAHMAN, R.; ABU BAKAR, F.; GOLKHANDAN, E. Effect of different temperatures on the free amino acids, physico-chemical and microbial changes during storage of Barramundi (*Lates calcarifer*) fillets. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 5, n. 7, p. 822–828, 2013.

YASSUE-CORDEIRO, P. H.; ZANDONAI, C. H.; SILVA, C. F; FERNANDES-MACHADO, N. R. C. Desenvolvimento e caracterização de filmes compósitos de quitosana e zeólitas com prata. **Polímeros**, v. 25, n. 5, p. 492–502, 2015.

YOUNES, I.; SELLIMI, S.; RINAUDO, M.; JELLOULI, K.; NASRI, M. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 57–63, 2014.

YUAN, G.; CHEN, X.; LI, D. Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. **Food Research International**, v. 89, p.117–128, 2016.

YUAN, G.; LV, H.; TANG, W.; ZHANG, X.; SUN, H. Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage. **Food Control**, v. 59 p. 818-823, 2016.

YUAN, G.; ZHANG, X.; TANG, W.; SUN, H. Effect of chitosan coating combined with green tea extract on the melanosis and quality of Pacific white shrimp during storage in ice. **CyTA - Journal of Food**, v. 14, n. 1, p. 35-40, 2016.

YU, D.; XU, Y.; REGENSTEIN, J. M.; XIA, W.; YANG, F.; JIANG, Q.; WANG, B. The effects of edible chitosan-based coatings on flavor quality of raw grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 242, p. 412–420, 2018.

ZHANG, B.; MA, L.; DENG, S.; XIE, C.; QIU, X. Shelf-life of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as affected by weakly acidic electrolyzed water ice-glazing and modified atmosphere packaging. **Food Control**, v. 51, p. 114-121, 2015.

ZHONG, Y.; SONG, X.; LI, Y. Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch-chitosan composite films as a function of acid solvent types. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 84, n. 1, p. 335-342, 2011.

ZOLDOS, P.; POPELKA, P.; MARCINČÁK, S.; NAGY, J.; MESARČOVÁ, L.; PIPOVÁ, M.; JEVINOVÁ, P.; NAGYOVÁ, A.; MALA, P. The effect of glaze on the quality of frozen stored Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) fillets under stable and unstable conditions. **Acta Veterinaria Brno**, v. 80, p. 299-304, 2011.

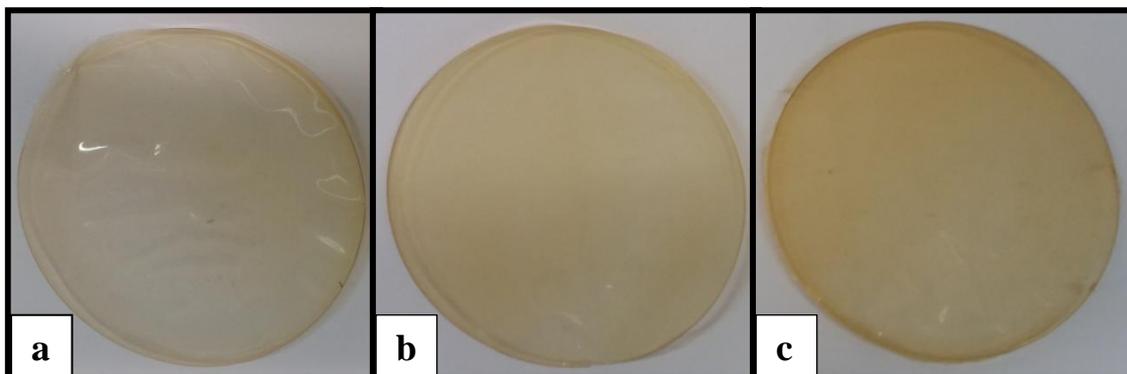
APÊNDICE A – ASPECTO DOS 39 REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS DE QUITOSANA E ÓLEOS ESSENCIAIS.



Q – Quitosana; CR - Óleo essencial de cravo; HO - Óleo essencial de hortelã, LI – Óleo essencial de limão; LO – Óleo essencial de louro; MA – Óleo essencial de manjeriço; TA – Óleo essencial de tangerina.

Fonte: Própria do autor (2017).

**APÊNDICE B – ASPECTO DOS FILMES COMESTÍVEIS DE QUITOSANA DE
1%(a), 1,5% (b) e 2%(c).**



Fonte Própria do autor (2017).

**APÊNDICE C - VALOR UNITÁRIO DO MATERIAL UTILIZADO PARA
A PRODUÇÃO DE FILMES E REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS.**

Quitosana comercial 1000 g (Polymar) - R\$ 120,00
Óleo essencial de Cravo 5 mL (BioEssência) - R\$ 24,00
Óleo essencial de Hortelã 10 mL (BioEssência) - R\$ 39,00
Óleo essencial de Limão – 10 mL (BioEssência) - R\$ 27,00
Óleo essencial de Louro – 5 mL (Terraflor) - R\$ 49,50
Óleo essencial de Manjeriçã – 5 mL (BioEssência) - R\$ 26,00
Óleo essencial de Tangerina – 10 mL (BioEssência) - R\$ 27,00
Ácido Láctico 85% PA 1000 mL (Dinâmica) – R\$ 39,90
Glicerina ou Glicerol PA 1000 mL (Dinâmica) – R\$ 29,00

Fonte Própria do autor (2018).

**APÊNDICE D – CUSTOS DE PRODUÇÃO DOS REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS
DE 1% DE QUITOSANA E ÓLEOS ESSENCIAIS (POR LITRO).**

Revestimento	Quitosana (R\$)	Óleo Essencial (R\$)	Solução de Ácido Lático 1% (R\$)	Glicerol 0,5% (R\$)	Valor Total (R\$)
1% Q	1,20	-	0,47	0,15	1,82
1% Q – CR 0,5%	1,20	24,00	0,47	0,15	25,82
1% Q – CR 1%	1,20	48,00	0,47	0,15	49,82
1% Q – HO 0,5%	1,20	19,50	0,47	0,15	21,32
1% Q – HO 1%	1,20	39,00	0,47	0,15	40,82
1% Q – LI 0,5%	1,20	13,50	0,47	0,15	15,32
1% Q – LI 1%	1,20	27,00	0,47	0,15	28,82
1% Q – LO 0,5%	1,20	49,50	0,47	0,15	51,32
1% Q – LO 1%	1,20	99,00	0,47	0,15	100,82
1% Q – MA 0,5%	1,20	26,00	0,47	0,15	27,82
1%Q – MA 1%	1,20	52,00	0,47	0,15	53,82
1%Q – TA 0,5%	1,20	13,50	0,47	0,15	15,32
1%Q – TA 1%	1,20	27,00	0,47	0,15	28,82

Q – Quitosana; CR - Óleo essencial de cravo; HO - Óleo essencial de hortelã, LI – Óleo essencial de limão; LO – Óleo essencial de louro; MA – Óleo essencial de manjeriço; TA – Óleo essencial de tangerina.

**APÊNDICE E – CUSTOS DE PRODUÇÃO DOS REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS
DE 1,5 % DE QUITOSANA E ÓLEOS ESSENCIAIS (POR LITRO).**

Revestimento	Quitosana (R\$)	Óleo Essencial (R\$)	Solução de Ácido Lático 1% (R\$)	Glicerol 0,5% (R\$)	Valor Total (R\$)
1,5% Q	1,80	-	0,47	0,15	2,42
1,5% Q - CR 0,5%	1,80	24,00	0,47	0,15	26,42
1,5% Q – CR 1%	1,80	48,00	0,47	0,15	50,42
1,5% Q - HO 0,5%	1,80	19,50	0,47	0,15	21,92
1,5% Q – HO 1%	1,80	39,00	0,47	0,15	41,42
1,5% Q – LI 0,5%	1,80	13,50	0,47	0,15	15,92
1,5%Q – LI 1%	1,80	27,00	0,47	0,15	29,42
1,5% Q – LO 0,5%	1,80	49,50	0,47	0,15	51,92
1,5% Q – LO 1%	1,80	99,00	0,47	0,15	101,42
1,5% Q – MA 0,5%	1,80	26,00	0,47	0,15	28,42
1,5% Q – MA 1%	1,80	52,00	0,47	0,15	54,42
1,5% Q – TA 0,5%	1,80	13,50	0,47	0,15	15,92
1,5% Q – TA 1%	1,80	27,00	0,47	0,15	29,42

Q – Quitosana; CR - Oléo essencial de cravo; HO - Óleo essencial de hortelã, LI – Oléo essencial de limão; LO – Óleo essencial de louro; MA – Óleo essencial de manjeriço; TA – Óleo essencial de tangerina.

**APÊNDICE F – CUSTOS DE PRODUÇÃO DOS REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS
DE 2% DE QUITOSANA E ÓLEOS ESSENCIAIS (POR LITRO).**

Revestimento	Quitosana (R\$)	ÓleoEssencial (R\$)	Solução de Ácido Lático 1% (R\$)	Glicerol 0,5% (R\$)	Valor Total (R\$)
2% Q	2,40	-	0,47	0,15	3,02
2% Q – CR 0,5%	2,40	24,00	0,47	0,15	27,02
2% Q – CR 1%	2,40	48,00	0,47	0,15	51,02
2% Q – HO 0,5%	2,40	19,50	0,47	0,15	22,52
2% Q – HO 1%	2,40	39,00	0,47	0,15	42,02
2% Q – LI 0,5%	2,40	13,50	0,47	0,15	16,52
2% Q – LI 1%	2,40	27,00	0,47	0,15	30,02
2% Q – LO 0,5%	2,40	49,50	0,47	0,15	52,52
2% Q – LO 1%	2,40	99,00	0,47	0,15	102,02
2% Q – MA 0,5%	2,40	26,00	0,47	0,15	29,02
2% Q – MA 1%	2,40	52,00	0,47	0,15	55,02
2% Q – TA 0,5%	2,40	13,50	0,47	0,15	16,52
2% Q – TA 1%	2,40	27,00	0,47	0,15	30,02

Q – Quitosana; CR - Óleo essencial de cravo; HO - Óleo essencial de hortelã, LI – Óleo essencial de limão; LO – Óleo essencial de louro; MA – Óleo essencial de manjeriço; TA – Óleo essencial de tangerina.

APÊNDICE G - VALORES DE pH, TBARS, BVT E TMA (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO) DAS AMOSTRAS DE CAMARÃO CONGELADO SUBMETIDAS A DIFERENTES TRATAMENTOS DURANTE 180 DIAS DE ESTOCAGEM.

AMOSTRA	TEMPO	pH	TBARS	BVT (mg/100g)	TMA (mg/100g)
C	T 1	7,10 ± 0,08	0,13 ± 0,01	2,27 ± 0,17	0,32 ± 0,12
	T 30	7,05 ± 0,02	0,13 ± 0,07	3,78 ± 0,50	0,69 ± 0,12
	T 60	6,66 ± 0,07	0,14 ± 0,01	5,71 ± 0,39	1,21 ± 0,25
	T 90	6,96 ± 0,02	0,20 ± 0,03	6,55 ± 0,19	2,11 ± 0,13
	T 120	6,97 ± 0,02	0,35 ± 0,01	7,14 ± 0,48	2,37 ± 0,12
	T 150	7,00 ± 0,05	0,29 ± 0,01	8,95 ± 0,42	2,75 ± 0,13
	T 180	7,20 ± 0,02	0,38 ± 0,01	9,95 ± 0,25	3,01 ± 0,12
G	T 1	6,98 ± 0,03	0,10 ± 0,02	2,10 ± 0,17	0,32 ± 0,12
	T 30	6,87 ± 0,03	0,12 ± 0,04	3,28 ± 0,50	0,58 ± 0,24
	T 60	6,86 ± 0,10	0,17 ± 0,04	5,50 ± 0,76	1,09 ± 0,13
	T 90	6,81 ± 0,04	0,21 ± 0,03	6,64 ± 0,17	1,93 ± 0,14
	T 120	6,87 ± 0,05	0,32 ± 0,01	6,85 ± 0,48	2,19 ± 0,15
	T 150	6,96 ± 0,03	0,30 ± 0,01	8,11 ± 0,25	2,64 ± 0,13
	T 180	7,14 ± 0,03	0,36 ± 0,01	8,95 ± 0,42	2,90 ± 0,12
Q	T 1	6,49 ± 0,02	0,47 ± 0,01	1,85 ± 0,19	0,26 ± 0,00
	T 30	6,16 ± 0,02	0,50 ± 0,04	2,35 ± 0,39	0,51 ± 0,21
	T 60	6,45 ± 0,04	0,51 ± 0,04	4,37 ± 0,27	0,71 ± 0,25
	T 90	6,34 ± 0,15	0,58 ± 0,01	4,54 ± 0,64	1,09 ± 0,13
	T 120	6,42 ± 0,05	0,72 ± 0,06	5,88 ± 0,58	1,35 ± 0,13
	T 150	6,48 ± 0,02	0,36 ± 0,01	6,97 ± 0,32	1,74 ± 0,12
	T 180	6,55 ± 0,04	0,77 ± 0,03	7,94 ± 0,56	1,99 ± 0,13
QT	T 1	6,47 ± 0,02	0,04 ± 0,02	1,85 ± 0,19	0,26 ± 0,00
	T 30	6,16 ± 0,02	0,05 ± 0,01	2,27 ± 0,32	0,45 ± 0,24
	T 60	6,31 ± 0,09	0,07 ± 0,01	3,70 ± 0,14	0,64 ± 0,15
	T 90	6,30 ± 0,015	0,09 ± 0,01	3,95 ± 0,17	0,83 ± 0,13
	T 120	6,32 ± 0,02	0,11 ± 0,02	5,21 ± 0,58	0,96 ± 0,13
	T 150	6,35 ± 0,02	0,10 ± 0,02	6,22 ± 0,19	1,16 ± 0,15
	T 180	6,49 ± 0,02	0,14 ± 0,04	7,81 ± 0,17	1,41 ± 0,14
QL	T 1	6,48 ± 0,04	0,07 ± 0,01	1,76 ± 0,17	0,26 ± 0,00
	T 30	6,14 ± 0,02	0,11 ± 0,03	2,18 ± 0,19	0,32 ± 0,12
	T 60	6,14 ± 0,1	0,11 ± 0,02	4,28 ± 0,17	0,57 ± 0,13
	T 90	6,31 ± 0,005	0,13 ± 0,02	4,45 ± 0,32	0,70 ± 0,13
	T 120	6,34 ± 0,02	0,15 ± 0,02	4,87 ± 0,19	0,90 ± 0,15
	T 150	6,37 ± 0,02	0,14 ± 0,02	5,88 ± 0,34	1,09 ± 0,13
	T 180	6,51 ± 0,04	0,17 ± 0,01	7,64 ± 0,17	1,22 ± 0,13

C - Camarão congelado (controle); G - Camarão congelado com glaciamento; Q - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana; QT - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de tangerina; QL - Camarão congelado com revestimento de 1,5% de quitosana + 0,5% de óleo essencial de limão.