



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

**CLÁUDIA BRANDÃO VIEIRA**

**FILMES E REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS DO POLISSACARÍDEO  
SULFATADO DA ALGA MARINHA VERMELHA *Gracilaria birdiae* NA  
QUALIDADE DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* CONGELADO**

**FORTALEZA**

**2019**

CLÁUDIA BRANDÃO VIEIRA

FILMES E REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS DO POLISSACARÍDEO SULFATADO  
DA ALGA MARINHA VERMELHA *Gracilaria birdiae* NA QUALIDADE DO  
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

2019

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)

---

V714f Vieira, Cláudia Brandão.  
Filmes e revestimentos comestíveis do polissacarídeo sulfatado da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* na qualidade do camarão *Litopenaeus vannamei* congelado / Cláudia Brandão Vieira. – 2019.  
110 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Prof. Bartolomeu Warlene Silva de Souza..

1. Filmes comestíveis. 2. Polissacarídeos sulfatados. 3. Camarão. I. Título.

CDD 639.2

---

CLÁUDIA BRANDÃO VIEIRA

FILMES E REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS DO POLISSACARÍDEO SULFATADO  
DA ALGA MARINHA VERMELHA *Gracilaria birdiae* NA QUALIDADE DO  
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

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

---

Prof. Dr. Reynaldo Amorim Marinho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Maria Nilka de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Juliana Rabelo de Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A minha querida e amada filha Alice. Razão  
do meu viver.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por estar sempre ao meu lado me confortando e me orientando em momentos difíceis. Sem Ti Senhor eu nada seria.

A todos os meus familiares que sempre acreditaram em mim e me apoiaram durante toda a minha jornada estudantil.

Ao Sécio pelo seu amor, apoio e incentivo.

A minha mãezinha que sempre esteve presente em tudo na minha vida. Mãe, sua amizade é fundamental pra mim. Se serei uma doutora, devo a ti, por todo amor, carinho e cuidado que toda mãe (e no seu caso “pãe”) tem para com um filho. Obrigada Deus por fazer com que nos encontrássemos nesse plano terrestre. EU TE AMO!

A minha filha tão esperada. Meu presente de Deus. Que mesmo sem entender ainda esta etapa evolutiva da minha vida, é um peça fundamental. Com o seu amor eu consigo tudo. Alicinha, mamãe te ama demais!

Ao prof. Bartolomeu meu agradecimento especial, que não só pra mim, mas para com todos os seus orientandos e colegas de trabalho se mostra uma pessoa tão generosa e humana. Obrigada pela acolhida tanto como funcionária no nosso querido Latepe e também como orientanda de doutorado.

A profa. Silvana pela orientação da formatação deste trabalho e bem como pelo carinho que sempre demonstrou pela minha pessoa desde a minha graduação. Meu muito obrigada!

Ao prof. Cals meu eterno agradecimento por não só ter sido meu primeiro chefe nesta instituição, mas acima de tudo um grande amigo que sempre me incentivou a continuar estudando e concretizar este sonho. Prof. Cals, eu não estaria aqui sem o seu apoio. Serei eternamente grata ao Sr.

Ao prof. Calíope, mais um grande amigo que fiz aqui na UFC. Obrigada por todo apoio e carinho que me fizeram chegar até aqui.

A Cláudia Cintia, minha colega de trabalho.

Ao Diego que foi peça fundamental na concretização da minha tese. Diego pra você eu só tenho a dizer: MUITO OBRIGADA!!! Este trabalho é nosso. A vida seria bem mais difícil sem a presença dos amigos.

A Cybelle, que também participou da execução desta pesquisa de forma tão responsável.

A Jaque pelo apoio e contribuição na parte final da minha tese.

A todos os componentes que fazem parte do Latepe e que me ajudaram de forma direta ou indireta.

Ao Rafael dos Santos Rocha pela contribuição na execução das análises antimicrobianas.

A todos da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) e em especial ao Prof. Men de Sá pela disponibilidade e apoio na realização das análises.

Aos professores integrantes da banca examinadora André Luis Coelho da Silva, Reynaldo Amorim Marinho, Maria Nilka de Oliveira e Juliana Rabelo de Sousa pela disponibilidade e sugestões que contribuirão para enriquecer este trabalho.

*“A verdadeira viagem do descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas sim em ter novos olhos”.*

Marcel Proust

## RESUMO

O interesse no desenvolvimento de filmes edíveis e biodegradáveis vem aumentando nos últimos anos. Principalmente devido à demanda por alimentos de alta qualidade e preocupações ambientais sobre o descarte de materiais não renováveis que são utilizados como embalagem para alimentos. As macroalgas vermelhas são ricas em polissacarídeos sulfatados (PS), tais como o ágar que é comercialmente explorado em toda a indústria alimentícia. Vários estudos já apresentaram boas propriedades mecânicas e de barreira na elaboração de filmes comestíveis a base de PS. O presente estudo teve por objetivos caracterizar o PS extraído da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* através das análises de DSC, TGA, FTIR; elaborar filmes comestíveis a base deste PS e determinar suas propriedades físicas, mecânicas e também a sua molhabilidade; verificar a atividade antimicrobiana da solução filmogênica e determinar a eficiência do filme de PS em camarão (*Litopenaeus vannamei*) congelado, descascado e sem cabeça através de análises físico-químicas e microbiológicas, bem como avaliar as perdas de peso do camarão, do glaciamento e do revestimento com PS durante o armazenamento. As análises térmicas de DSC e TGA constataram que o PS do presente estudo é termoestável e pode ser usado na formação de biomateriais. A análise de FTIR detectou a presença de grupos funcionais característicos de agarocolóides. Os valores de PVA aumentaram com a concentração de glicerol a 0,1% e os filmes apresentaram-se bastante solúveis em água. Quanto às propriedades óticas, os filmes apresentaram luminosidade, baixa opacidade e uma leve tendência a uma coloração verde amarelada. Os valores de tensão e deformação na ruptura praticamente não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), dentre as formulações avaliadas. De acordo com coeficiente de espalhamento a solução escolhida foi a que continha 1,0% de PS e 0,0% de glicerol. A concentração (1,0%) de PS testada não apresentou inibição do crescimento bacteriano. O tratamento CRPS apresentou uma menor taxa de perda de revestimento de PS. Os valores de pH, TBARS e BVT das amostras de camarão apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. As amostras revestidas com PS apresentaram as menores contagens de bactérias psicrófilas. O filme edível elaborado no presente estudo possui grande potencial como revestimento comestível e pode ser utilizado para aumentar a vida de prateleira de pescados resfriados, principalmente por ser inócuo ao consumidor e biodegradável no meio ambiente.

**Palavras-chave:** Filmes comestíveis. Polissacarídeos sulfatados. Camarão.

## ABSTRACT

In recent years the interest in the development of edible and biodegradable films has been growing. Mostly because of the demand for high-quality food, environmental concerns about the disposal of non-renewable materials that are used as packaging for food and also as opportunities to create new markets of raw materials for elaboration of coatings, like carbohydrates, proteins, hydrocolloids, lipids, etc. The red macroalgae are rich in sulphated polysaccharides (SP), such as agar that is commercially prospected throughout the food industry and several researches have already been carried out, related to the elaboration of edible films and showed good mechanical and barrier properties. The present study aimed to characterize the SP extracted from the red algae *Gracilaria birdiae* through the DSC, TGA, FTIR analysis; to elaborate edible films based on this SP and to evaluate its physical and mechanical properties and scattering coefficient; to verify the antimicrobial activity of the film-forming solution and to determine the efficiency of the SP film in frozen, peeled and headless shrimp (*Litopenaeus vannamei*) through physico-chemical and microbiological analysis, as well as to evaluate shrimp, glazing and SP coating weight losses. DSC and TGA suggest that the SP of the present study is thermostable and can be used in the formation of biomaterials. The FTIR analysis detected the presence of functional groups characteristic of agarocolloids. WVP values increased with 0.1% glycerol concentration and the films were quite soluble in water. The films were luminous, slightly opaque and with a slight tendency to a yellowish-green coloration. The tension and deformation values during the rupture didn't present significant differences ( $p < 0,05$ ). According to the scattering coefficient, the solution chosen was the one containing 1.0% SP and 0.0% glycerol. The concentration (1.0%) of SP tested showed no inhibition of bacterial growth. The pH, TBARS and TVB values of the shrimp samples presented significant differences ( $p < 0,05$ ) between treatments. SP-coated samples showed the lowest counts of psychrotrophic bacteria. The edible films elaborated in the present study have great potential as edible coatings and can be used to increase the shelf life of cooled fish, mainly because it is harmless to the consumer and biodegradable in the environment.

**Keywords:** Edible films. Sulphated polysaccharides. Shrimp.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Alga marinha vermelha <i>Gracilaria Birdiae</i> (Escala: 2 cm) .....	28
Figura 2	- Fórmula estrutural da agarose .....	30
Figura 3	- Camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	31
Figura 4	- Fluxograma do processo de extração do polissacarídeo sulfatado da <i>Gracilaria birdiae</i> .....	36
Figura 5	- Fluxograma do preparo das soluções dos filmes e revestimentos comestíveis de polissacarídeo sulfatado extraído da <i>Gracilaria birdiae</i> .....	40
Figura 6	- Célula de permeação para determinação da PVA .....	41
Figura 7	- Sistema para cor através do método de Hunter .....	42
Figura 8	- Esquema representativo das três tensões interfaciais da gota de um líquido na superfície sólida .....	46
Figura 9	- Fluxograma da Contagem Padrão em Placas (CPP) de bactérias psicotróficas nas amostras de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i> congelado, descascado e sem cabeça durante o período de estocagem de 180 dias .....	56
Figura 10	- Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) do PS da <i>Gracilaria birdiae</i> .....	59
Figura 11	- Análise Termogravimétrica do PS da <i>Gracilaria birdiae</i> .....	61
Figura 12	- a) Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para O PS extraído da <i>Gracilaria birdiae</i> na faixa de 4500 a 500 $\text{cm}^{-1}$ . b) Ampliação da FTIR para o PS extraído da <i>Gracilaria birdiae</i> na faixa de 1500 a 500 $\text{cm}^{-1}$ .....	63
Figura 13	- Filme elaborado com PS de <i>Gracilaria birdiae</i> .....	64
Figura 14	- Perda de peso para o grupo controle (CSR) dos exemplares de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> congelados, descascados e sem cabeças, por um período de 180 dias .....	78
Figura 15	- Perda de glaciamento e de revestimento para os tratamentos (CG e CRPS) dos exemplares de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> congelados, descascados e sem cabeças, por um período de 180 dias .....	79

Figura 16	-	Valores médios de pH dos exemplares de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i> congelado, descascado e sem cabeça; submetidos a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem .....	82
Figura 17	-	Valores médios de N- BVT (mg/100g) dos exemplares de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i> congelado, descascado e sem cabeça; submetidos a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem .....	84
Figura 18	-	Valores médios de TBARS dos exemplares de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i> congelados descascados e sem cabeça, submetidos a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem	86
Figura 19	-	Quantificação de bactérias psicotróficas em exemplares de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> congelados, descascados e sem cabeça, durante 180 dias de estocagem .....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Rendimento e composição química dos PS de <i>Gracilaria birdiae</i> ....	57
Tabela 2	- Valores de Permeabilidade ao vapor da água (PVA), solubilidade e espessura (média $\pm$ desvio padrão) dos filmes de polissacarídeo sulfatado (1,0; 1,5 e 2,0%) obtido da alga vermelha <i>Gracilaria birdiae</i> com diferentes concentrações de glicerol (0,0; 0,1 e 0,2%) ..	65
Tabela 3	- Valores de Luminosidade, a*, b* e Opacidade (média $\pm$ desvio padrão) dos filmes de polissacarídeo sulfatado (1,0; 1,5; e 2,0%) obtido da alga vermelha <i>Gracilaria birdiae</i> com diferentes concentrações de glicerol (0,0; 0,1 e 0,2%) .....	69
Tabela 4	- Valores da média ( $\pm$ desvio padrão) das propriedades mecânicas dos filmes de polissacarídeo sulfatado (1,0; 1,5; e 2,0%) obtidos da alga vermelha <i>Gracilaria birdiae</i> com diferentes concentrações de glicerol (0,0; 0,1 e 0,2%) .....	71
Tabela 5	- Coeficiente de espalhamento ( $W_s$ ) para o teste de diferentes concentrações de quitosana e glicerol .....	74
Tabela 6	- Verificação da atividade antimicrobiana através do método de difusão de disco para a concentração de 1,0% de PS extraído da alga vermelha <i>Gracilaria birdiae</i> e água destilada estéril (Controle) frente às bactérias Gram positivas ( <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ) e Gram negativas ( <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella entérica</i> ) .....	75
Tabela 7	- Composição química (média $\pm$ desvio padrão) dos exemplares de camarão <i>Litopenaeus vanammei</i> congelados, descascados e sem cabeça, submetidos a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem .....	80
Tabela 8	- Logarítmo da Media dos valores das Unidades Formadoras de Colônias das bactérias psicrotróficas detectadas no músculo de exemplares de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> congelados, descascados e sem cabeça, durante 180 dias de estocagem .....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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>
ICMS	<i>International Commission on Microbiological Specifications</i>
PS	Polissacarídeo sulfatado
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

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	22
<b>2.1</b>	<b>Filmes e revestimentos comestíveis</b> .....	22
<b>2.2</b>	<b>Propriedades físicas dos filmes comestíveis</b> .....	24
<b>2.2.1</b>	<i>Permeabilidade ao vapor de água</i> .....	24
<b>2.2.2</b>	<i>Solubilidade em água</i> .....	25
<b>2.2.3</b>	<i>Cor e Opacidade</i> .....	25
<b>2.2.4</b>	<i>Propriedades mecânicas - resistência à tração (TS) e alongação à quebra</i> .....	26
<b>2.3</b>	<b>Matérias primas utilizadas na formulação de filmes e revestimentos comestíveis biodegradáveis</b> .....	26
<b>2.4</b>	<b>Polissacarídeos de algas marinhas</b> .....	27
<b>2.5</b>	<b>Camarão</b> .....	31
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
<b>3.1</b>	<b>Material biológico</b> .....	34
<b>3.1.1</b>	<i>Obtenção dos exemplares da alga marinha vermelha <i>Gracilaria birdiae</i></i> .....	34
<b>3.1.2</b>	<i>Obtenção dos exemplares de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i></i> .....	34
<b>3.2</b>	<b>Processo de extração do polissacarídeo sulfatado da <i>Gracilaria birdiae</i></b> .....	35
<b>3.3</b>	<b>Caracterização do polissacarídeo sulfatado da <i>Gracilaria birdiae</i></b> .....	37
<b>3.3.1</b>	<i>Composição química do polissacarídeo</i> .....	37
<b>3.3.1.1</b>	<i>Determinação do conteúdo de sulfato</i> .....	37
<b>3.3.1.2</b>	<i>Determinação do conteúdo de carboidrato</i> .....	37
<b>3.3.1.3</b>	<i>Determinação do conteúdo de proteína</i> .....	37
<b>3.4</b>	<b>Degradação térmica do polissacarídeo sulfatado da <i>Gracilaria birdiae</i></b> .....	38
<b>3.4.1</b>	<i>Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)</i> .....	38
<b>3.4.2</b>	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i> .....	38

3.5	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	39
3.6	Produção e caracterização dos filmes de polissacarídeo sulfatado da <i>Gracilaria birdiae</i>	39
3.6.1	<i>Preparo das soluções dos filmes e revestimentos comestíveis</i>	39
3.7	Propriedades físicas dos filmes comestíveis do polissacarídeo sulfatado da <i>Gracilaria birdiae</i>	41
3.7.1	<i>Permeabilidade ao vapor de água</i>	41
3.7.2	<i>Solubilidade</i>	42
3.7.3	<i>Cor e Opacidade</i>	42
3.8	Propriedades mecânicas	43
3.8.1	<i>Corpos de prova</i>	43
3.8.2	<i>Ensaio de tração</i>	43
3.9	Molhabilidade dos filmes de polissacarídeo sulfatado em camarão	44
3.9.1	<i>Tensão superficial crítica</i>	44
3.9.2	<i>Capacidade molhante</i>	46
3.10	Avaliação da atividade antimicrobiana da solução filmogênica de polissacarídeo sulfatado da <i>Gracilaria birdiae</i>	47
3.10.1	<i>Bactérias-teste</i>	47
3.10.1.1	<i>Preparo dos inóculos bacteriano</i>	47
3.11	Elaboração das soluções filmogênicas de polissacarídeo sulfatado da <i>Gracilaria birdiae</i>	48
3.12	Aplicação do revestimento obtido do polissacarídeo sulfatado da <i>Gracilaria birdiae</i> em exemplares do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> congelados, descascados e sem cabeça	48
3.12.1	<i>Aplicação da solução filmogênica de PS a 1,0% em exemplares de camarão Litopenaeus vannamei congelados, descascados e sem cabeça</i>	49
3.13	Análises das perda de peso, de glaciamento e de revestimento	49
3.13.1	<i>Perda de peso</i>	49
3.13.2	<i>Perda de glaciamento</i>	50
3.14	Análises físico-químicas	50
3.14.1	<i>Composição centesimal</i>	50

3.14.1.1	<i>Determinação da umidade</i> .....	51
3.14.1.2	<i>Determinação da matéria mineral (Cinzas)</i> .....	51
3.14.1.3	<i>Determinação da proteína bruta</i> .....	52
3.14.1.4	<i>Determinação do extrato etéreo (lipídios)</i> .....	52
3.14.2	<b>Análises físico-químicas e microbiológicas dos exemplares de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> congelados, descascados e sem cabeça</b> .....	53
3.14.2.1	<i>Medição do pH</i> .....	53
3.14.2.2	<i>Bases nitrogenadas voláteis totais (TVB-N)</i> .....	53
3.14.2.3	<i>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i> .....	54
3.14.3	<b>Análises microbiológicas</b> .....	54
3.14.3.1	<i>Determinação do Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)</i> .....	55
3.15	<b>Análises estatísticas</b> .....	56
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	57
4.1	<b>Rendimento e composição química dos polissacarídeos sulfatados da <i>Gracilaria birdiae</i></b> .....	57
4.2	<b>Análises térmicas do polissacarídeo sulfatado da <i>Gracilaria birdiae</i></b> .....	58
4.2.1	<i>Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)</i> .....	58
4.2.3	<i>Termogravimetria (TGA)</i> .....	61
4.3	<b>Análise de Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)</b> .....	62
4.4	<b>Caracterização do filme comestível obtido do polissacarídeo sulfatado da <i>Gracillaria birdiae</i></b> .....	64
4.4.1	<i>Obtenção e descrição do filme</i> .....	64
4.4.2	<i>Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade</i> .....	64
4.4.3	<i>Cor e Opacidade</i> .....	69
4.4.4	<i>Propriedades mecânicas</i> .....	71
4.4.5	<i>Determinação do coeficiente de espalhamento</i> .....	73
4.4.6	<i>Atividade antimicrobiana</i> .....	74
4.5	<b>Determinação das perdas de peso, de glaciamento e de revestimento</b> .....	76
4.6	<b>Composição centesimal</b> .....	80
4.7	<b>Análises físico-químicas dos exemplares de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> congelados, descascados e sem cabeça</b> .....	81

4.7.1	<i>Potencial hidrogeniônico (pH)</i> .....	81
4.7.2	<i>Nitrogênio das bases voláteis totais (N-BVT)</i> .....	83
4.7.3	<i>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i> .....	85
4.8	<b>Contagem de bactérias psicotróficas nos exemplares de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> congelados, descascados e sem cabeça durante 180 dias de estocagem</b> .....	87
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	91
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	92

## 1 INTRODUÇÃO

O emprego de revestimentos comestíveis com a finalidade de prolongar a conservação de alimentos perecíveis tem sido amplamente relatado (DEBEUFORT *et al.*, 1998; HAN *et al.*, 2005; TANADA-PALMU; GROSSO, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2007).

Segundo Vicente *et al.* (2010) revestimentos e filmes edíveis são termos usados na área alimentar e, muitas vezes sem distinção. Contudo, é importante fazer a distinção destes dois termos: o filme é uma película formada pela secagem (*casting*) da solução do biopolímero preparada separadamente do alimento, que é posteriormente aplicado; enquanto que o revestimento pode ser uma suspensão ou uma emulsão aplicada diretamente na superfície do alimento que após secagem leva à formação de um filme. A função a ser desempenhada pelo filme e/ou revestimento depende do produto alimentício e principalmente do tipo de deterioração a que este produto está submetido (KESTER; FENNEMA, 1986).

Existe um grande interesse no desenvolvimento de filmes edíveis ou degradáveis biologicamente, principalmente devido à demanda por alimentos de alta qualidade, preocupações ambientais sobre o descarte de materiais não renováveis (utilizados como embalagem para alimentos) e oportunidades para criar novos mercados de matérias-primas formadoras de revestimentos, tais como carboidratos, proteínas, lipídios, dentre outros (PALMU, 2003; FAKHOURI *et al.*, 2005). Assim sendo, a pesquisa e caracterização dessas novas embalagens vem aumentando nos últimos anos devido principalmente às suas propriedades biodegradáveis (FALGUERA *et al.*, 2011) e por serem oriundas de recursos naturais renováveis (CAZON *et al.*, 2017).

Os polissacarídeos são comumente encontrados em fontes animais, fungos, bactérias e plantas – incluindo as algas (RINAUDO, 2008; CUNHA, DE PAULA; FEITOSA, 2009). Nos últimos anos, os recursos marinhos têm atraído a atenção na busca de compostos bioativos para o desenvolvimento de novos medicamentos e alimentos saudáveis. Em particular, as algas marinhas são um recurso muito importante e comercialmente valioso para as áreas alimentícia, agrícola e farmacêutica (SOUZA *et al.*, 2012).

As macroalgas marinhas também são conhecidas por exibirem várias atividades biológicas e fisiológicas, incluindo ação anticoagulante, antiviral, antitumoral, antiinflamatória e antioxidante (BECKER *et al.*, 2007; LIMA, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2008). Essas propriedades são devidas principalmente a síntese de polissacarídeos sulfatados (PS), que são macromoléculas complexas e heterogêneas dotadas de radical sulfato que podem estar presentes tanto em tecidos animais (BURSON *et al.*, 1956; MATHEWS, 1975; MOURÃO;

PEREIRA, 1999; SOUZA *et al.*, 2007) quanto em vegetais (algas e gramíneas marinhas) (PAINTER, 1983; AQUINO *et al.*, 2005). Nas algas vermelhas (Rhodophyceae) esses PS podem se apresentar na forma de galactanas (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967).

Estes polímeros podem ser utilizados em produtos alimentícios como filmes e/ou revestimentos comestíveis devido à sua biodegradabilidade e também por possuírem propriedades conservantes, que apresentam grandes benefícios para o meio ambiente e para a saúde humana (SHIT; SHAH, 2014).

A crescente demanda do consumidor por alimentos com maior qualidade e prolongado prazo de validade, têm intensificado a busca de novos métodos e tecnologias para a melhor conservação de alimentos. A aplicação de uma película comestível sobre o músculo de pescados vem demonstrando um futuro bastante promissor na área alimentícia (VÁSCONEZ *et al.*, 2009; PEREDA *et al.*, 2011).

O consumo mundial *per capita* de pescado e produtos derivados da pesca vem crescendo gradualmente nas últimas décadas (NOMURA, 2010). Isto se deve ao fato deste alimento ser uma rica fonte de proteínas de alta qualidade, apresentando também vitaminas essenciais e ácidos graxos poli-insaturados (MOHAN *et al.*, 2010).

Um pescado que vem tendo seu cultivo em ascensão em escala mundial é o camarão. No entanto, questões sobre sua forma de estocagem têm sido levantadas. Este crustáceo é naturalmente perecível e sua qualidade depende de vários fatores. O processo de deterioração acontece mais rápido do que nos peixes devido ao elevado conteúdo de metabólitos de pequeno peso molecular, bem como aminoácidos livres, que ficam mais disponíveis para a nutrição bacteriana após a morte (FÁTIMA; KHAN; QADRI; 1988; MADRID, 1998).

Visando atender às necessidades de um mercado consumidor cada vez mais exigente e especificamente preocupado com a qualidade e inocuidade dos produtos alimentícios, surgem as embalagens ecologicamente corretas (ROONEY, 1995; LÓPEZ-RUBIO *et al.*, 2004; SOUZA; DITCHFIELD; TADINI; 2010) o que traz vantagens em relação às embalagens convencionais que são produzidas com material polimérico convencional derivado de petróleo (ARVANITTOYANNIS; BILIADERIS, 1998; DAINELLI *et al.*, 2008; VEIGA-SANTOS; DITCHFIELD; TADINI, 2011).

Neste contexto, é importante conhecer cada vez mais as propriedades funcionais dos filmes em relação não apenas ao alimento, mas também aos diversos fatores a que estarão expostos, o que indica a necessidade de novas pesquisas sobre aspectos básicos e aplicados destes compostos.

Considerando o interesse crescente pelo desenvolvimento de embalagens ecologicamente corretas oriundas de recursos naturais, este trabalho teve como objetivo geral elaborar filmes comestíveis a base de polissacarídeo sulfatado (PS) extraído da alga vermelha marinha *Gracilaria birdiae* e avaliar a sua eficiência na qualidade do camarão *Litopenaeus vannamei* congelado, descascado e sem cabeça.

Para isso, os objetivos específicos foram os seguintes: extrair o PS e em seguida determinar o seu rendimento; realizar a caracterização química e térmica do PS e verificar a sua bioatividade em termos de atividade antimicrobiana; caracterizar as propriedades físicas e mecânicas dos filmes e revestimentos comestíveis em diferentes concentrações do polímero e do plastificante; aplicar a solução filmogênica em exemplares de camarão *Litopenaeus vannamei* congelados, descascados e sem cabeça; determinar a perda de peso, de glaciamento e de revestimento e verificar a ação do revestimento de PS através de parâmetros de qualidade tais como os físico-químicos e microbiológicos, além de determinar a composição centesimal dos exemplares de camarão no início e no final do experimento em questão e por último aplicar análises estatísticas nos dados encontrados.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Filmes e revestimentos comestíveis

Historicamente a embalagem representou uma importante ferramenta para o desenvolvimento do comércio e para o crescimento das cidades. Proteger, conter e viabilizar o transporte dos produtos eram as funções iniciais das embalagens. Com o desenvolvimento da humanidade e de suas atividades econômicas, a embalagem foi incorporando novas funções e passou a conservar, expor, vender os produtos e por fim conquistar o consumidor por meio de seu visual atraente e comunicativo (MESTRINER, 2002).

Semelhante às embalagens de alimentos, que já nos anos 5000 a.C. existiam na forma de cestas e bolsas confeccionadas com produtos de origem animal e vegetal, além de primitivos recipientes de cerâmica, os filmes comestíveis e revestimentos recentes não são senão o aperfeiçoamento de técnicas aplicadas desde longa data (SOROKA, 1995).

As coberturas denominadas “comestíveis” como são conhecidas atualmente são mais recentes, e datam das décadas finais do século passado, quando os produtores tiveram seu interesse por elas aumentado devido à expansão da oferta de produtos alimentícios, principalmente os mais processados (ASSIS; LEONI, 2003).

Segundo Krochta, De Mulder-Johnston (1997) filme comestível é definido como uma fina camada de material comestível, formado diretamente como revestimento, ou como revestimento pré-formado e colocado sobre o alimento ou entre seus componentes. Maia; Porte; Souza, (2000) afirmam que os filmes comestíveis são películas de variadas espessuras constituídas por diferentes substâncias naturais e/ou sintéticas que se polimerizam e isolam o alimento, sem riscos à saúde do consumidor, uma vez que não são metabolizados pelo organismo e sua passagem pelo trato gastrointestinal se faz de maneira inócua.

As principais funções dos filmes e revestimentos comestíveis são: inibir a migração de umidade, do oxigênio, do dióxido de carbono, de aromas, dos lipídios e outros solutos; carrear aditivos alimentares e agentes antimicrobianos; melhorar a integridade mecânica e as características de manuseio de alimentos (KESTER; FENNEMA, 1986; KROCHTA; DE MULDER-JOHNSTON, 1997; NELSON; FENNEMA, 1991).

As embalagens de alimentos podem ser produzidas de diversas fontes. Dentre elas se destacam as embalagens plásticas que podem ser de origem natural ou sintética. Tradicionalmente grande parte das embalagens plásticas é sintética e a sua maioria é

produzida de polímeros derivados do petróleo, principalmente devido algumas vantagens em relação aos outros materiais tradicionais (KOLYBABA *et al.*, 2008).

Os materiais poliméricos são sólidos, não-metálicos de alto peso molecular e apresentam diferentes características dependendo de sua composição (CALLISTER, 2000). Há uma grande variedade desses materiais, tanto renováveis quanto de origem não renovável e são empregados como fonte de matéria-prima para materiais poliméricos modernos. Plásticos que são formados a partir de matérias-primas não-renováveis são geralmente de origem fóssil, têm formato de um composto em que uma matriz polimérica apresenta uma fase dominante com uma base praticamente impenetrável, em torno de materiais de enchimento como fibras de vidro ou de carbono (WILLIAMS *et al.*, 2000).

Cerca de 30 % dos plásticos de fontes não-renováveis, como o petróleo, são utilizados como embalagens (SIRACUSA *et al.*, 2008), sendo os mais utilizados o polietileno tereftalato (PET), policloreto de vinila (PVC), polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (AG) e poliamida (PA). Isto, porque tais materiais apresentam características úteis como maleabilidade, leveza, transparência, facilidade de impressão, boa selagem térmica, resistência à tração e barreira ao oxigênio (ALVES *et al.*, 2006; SIRACUSA *et al.*, 2008; SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010).

Porém é bem sabido que as embalagens sintéticas têm originado sérios problemas ecológicos devido ao fato de não serem biodegradáveis. Neste contexto, acredita-se que os biopolímeros constituem uma fonte alternativa para o desenvolvimento de embalagens devido à sua biodegradabilidade (PINHEIRO *et al.*, 2010).

A biodegradação é um processo natural e complexo onde compostos orgânicos, pelo intermédio de mecanismos bioquímicos, são convertidos em compostos mineralizados simples e, então, redistribuídos no meio ambiente, através do ciclo elementar, tais como os de carbono, nitrogênio e enxofre (SALAME, 1986).

Em síntese, a biodegradação de um polímero é um processo intrínseco pelo qual microrganismos e suas enzimas consomem este polímero como fonte de nutrientes, em condições normais de umidade, temperatura e pressão. Os polímeros melhor adaptados à biodegradação completa são os naturais, aqueles hidrolisáveis a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, ou a CH<sub>4</sub> e os polímeros sintéticos, que possuam estruturas próximas aos naturais (LIMA, 2004; BARDI; ROSA, 2007).

## 2.2 Propriedades físicas dos filmes comestíveis

### 2.2.1 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade dos filmes consiste na medida obtida através da passagem de um permeante de um lado do filme para o outro quando ambos são expostos às concentrações distintas de permeante em um determinado tempo, a qual é mensurada pela diferença de peso e estabelece a temperatura, umidade relativa, espessura e diferença de pressão parcial. Em filmes comestíveis, a permeabilidade de gases e vapores geralmente ocorre devido a mecanismos de difusão capilar e difusão molecular, sendo o primeiro dominante em materiais porosos ou com alguma imperfeição, e o segundo envolvendo a solubilidade do gás permeante no filme, difusão através do filme e dessorção do outro lado do filme (FERREIRA, 2006).

O potencial dos revestimentos e filmes edíveis é essencialmente baseado numa combinação de propriedades tais como: barreira ao vapor de água, oxigênio, dióxido de carbono, sabores, aromas e cor que permitem que este tipo de aplicação aumente e melhore o tempo de prateleira de alimentos. Muitas vezes essas propriedades dependem do polímero usado, dos constituintes adicionados, das condições de armazenamento, do tipo de aplicação, etc (PINHEIRO *et al.*, 2010).

A difusão ativada, principal mecanismo para o fluxo de gases e vapor, mostra-se dependente da estrutura do polímero para realizar o transporte do permeante, uma vez que esta afeta diretamente a mobilidade dos segmentos das cadeias. Fatores que alteram a estrutura do polímero influenciam suas propriedades de transporte de massa (JASSE, SEUVRE; MATHLOUTHI, 1994).

Várias propriedades dos polímeros influenciam a sua permeabilidade, tais como: permeabilidade a vapor de água, oxigênio e dióxido de carbono. Para melhor entender as propriedades de transporte, torna-se imprescindível conhecer algumas características dos filmes, tais como: a estrutura do polímero, o grau de polaridade, o espaço intersticial entre as moléculas do polímero (volume livre), a mobilidade das cadeias do polímero (cristalinidade) e o alinhamento das ramificações do polímero na cadeia principal (orientação) (MILLER; KROCHTA, 1997).

### **2.2.2 Solubilidade em água**

A solubilidade dos filmes fornece informações sobre a sua integridade em sistemas aquosos e indica qual a sua resistência à água. Para, além disso, poder fornecer uma indicação sobre a biodegradabilidade do filme, que é uma característica importante se este for usado como embalagem (GNANASAMBADAM; HETTIARACHCHY; COLEMAN; 1997).

Quando o objetivo é proporcionar a preservação de alimentos com grande quantidade de água e com liberação de antimicrobianos, são necessários filmes de baixa solubilidade (OZDEMIR; FLOROS; 2008). No entanto, em alguns casos, uma solubilidade moderada é desejada, podendo ser vantajosa, por exemplo, ao cozinhar alimentos revestidos (LAOHAKUNJIT; NOOMHORN; 2004).

### **2.2.3 Cor e Opacidade**

A opacidade de um filme é um indicador da quantidade de luz que o atravessa. Quanto maior o valor de opacidade, menor será a quantidade de luz que atravessa o filme podendo esta barreira ser importante para controlar a incidência de luz nos produtos alimentares.

A cor pode ser considerada um importante parâmetro na caracterização dos filmes, pois está relacionada com a matéria-prima utilizada na elaboração dos mesmos (VICENTINI, 2003) e este parâmetro possui grande relevância na aceitação do consumidor pelo produto revestido (PINHEIRO *et al.*, 2010). A cor de um filme pode ser avaliada tanto por transmitância quanto por absorvância e vai depender do tipo de material utilizado na formulação dos filmes (VEIGA-SANTOS *et al.*, 2005).

A coloração e a opacidade dos filmes não devem ser alteradas ao longo do armazenamento do material, uma vez que essa mudança de aspecto pode prejudicar a aceitação do produto (SAKANAKA, 2002).

Oliveira *et al.* (1996) afirmam que para uma boa apresentação visual do produto é desejável que as embalagens plásticas apresentem elevado brilho e alta transparência. Por outro lado, muitas vezes a proteção contra a incidência de luz se faz necessária (transparência baixa ou nula), como no acondicionamento de produtos sensíveis a reações de deterioração catalisadas pela luz. Portanto, a cor deve ser determinada, mas não é fator limitante de uso.

### **2.2.4 Propriedades mecânicas - resistência à tração (TS) e alongação à ruptura**

Filmes e revestimentos edíveis com propriedades mecânicas satisfatórias e boa aparência são potenciais alternativas aos filmes sintéticos usados. As propriedades mecânicas traduzem o comportamento dos materiais quando sujeitos a uma tensão ou deformação e têm uma grande relevância para muitas das aplicações dos filmes de biopolímeros. Alguns dos testes aplicados nos filmes sintéticos comerciais são também usados para caracterizar os filmes edíveis. É o caso da resistência à tração, da alongação, do módulo elástico e da compressão (PINHEIRO *et al.*, 2010).

Nos últimos anos têm surgido alguns estudos onde as propriedades mecânicas e térmicas dos filmes edíveis são caracterizadas e relacionadas com a estrutura do polímero, a concentração de plastificante, as condições de armazenamento e a incorporação de compostos (MALI *et al.*, 2006).

Casariego *et al.* (2009) verificaram que o aumento da concentração de polímero leva a um acréscimo dos valores de resistência à tração, levando a uma estrutura mais forte no filme (este fenômeno também foi verificado para filmes de galactomananos, onde o aumento da concentração, para o mesmo valor de glicerol, originou um aumento dos valores da resistência à tração e uma diminuição da alongação) (CERQUEIRA *et al.*, 2010).

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).

## **2.3 Matérias primas utilizadas na formulação de filmes e revestimentos comestíveis biodegradáveis**

O crescente interesse em melhorar a qualidade do meio ambiente, aliado ao acúmulo de lixo não biodegradável, tem incentivado pesquisas em todo o mundo no sentido de incrementar e desenvolver embalagens biodegradáveis provindas de fontes renováveis, tais como os polímeros de origem natural (GUO *et al.*, 1998; PRAJAPATI *et al.*, 2014).

As macromoléculas biológicas mais estudadas para este fim são as proteínas e os polissacarídeos, polímeros capazes de formar matrizes contínuas e, que através de diversas técnicas de produção, podem ser transformados em filmes e/ou revestimentos comestíveis biodegradáveis (MALI; GROSSMANN, 2003).

Os revestimentos à base de proteínas têm geralmente propriedades mecânicas e de barreira superiores às dos formados por polissacarídeos, graças à estrutura das proteínas, capaz de conferir maiores propriedades funcionais. Os revestimentos lipídicos são geralmente usados por sua excelente barreira a umidade; entretanto, apresentam algumas desvantagens no que se refere à estabilidade (susceptibilidade a oxidação) e características sensoriais (sabor e textura às vezes desagradáveis) (CUQ *et al.*, 1995).

Os polissacarídeos são polímeros de carboidratos que podem ser formados de um tipo único de monossacarídeos ou de diferentes tipos. São solúveis em água, onde desempenham importante papel como espessante, gelificante, emulsificante e hidratante (RINAUDO, 2008). São comumente encontrados em fontes animais, fungos, bactérias e plantas (incluindo as algas) (CUNHA; DE PAULA; FEITOSA, 2009).

Os polissacarídeos de origem vegetal têm sido avaliados como uma alternativa consideravelmente econômica e eficiente para a elaboração de filmes e/ou revestimentos comestíveis (GUERRERO *et al.*, 2016; ZHANG, MADBOULY; KESSLER; 2015). Essas macromoléculas são hidrofílicas, formam revestimentos com eficiente barreira contra compostos de baixa polaridade, tais como lipídios, entretanto, não constituem boa barreira a umidade (KESTER; FENNEMA, 1986).

A escolha do material a ser utilizado na formulação dos filmes e revestimentos é muito importante, pois desta dependerão as interações entre os componentes do material, que poderão interferir nas propriedades de barreira, mecânicas e sensoriais dos filmes (BALDWIN; CARRIEDO, 1994).

## **2.4 Polissacarídeos de algas marinhas**

Algas marinhas vermelhas ou macroalgas (Rhodophyceae) são filogeneticamente a mais antiga divisão de macrófitas marinhas. Elas contêm galactanos sulfatados, tais como a carragenana e ágar como os principais materiais estruturais das paredes celulares e matrizes intercelulares, que são comercialmente explorados em toda a indústria alimentar (ALBA; KONTOGIORGOS, 2019).

As algas comumente pertencem a quatro grupos diferentes determinados com base na cor, sendo elas: algas azuis, vermelhas, verdes e pardas (KILINÇ *et al.*, 2013). Dentre as classes citadas anteriormente, somente as algas vermelhas e pardas são comumente fontes de polissacarídeos (ágar, carragenanas e alginatos) com significativa importância comercial por

apresentarem propriedades gelificantes, espessantes, estabilizantes dentre outras (RAVEN; EVERT; EICHORN, 1996).

Inicialmente, a produção de ágar era limitada apenas a vários locais onde as espécies do gênero *Gelidium* crescem produzindo ágares com propriedades gelificantes superiores. No entanto, a adoção de um pré-tratamento alcalino de espécies de algas do gênero *Gracilaria* resultou na expansão da indústria do ágar. Atualmente, os maiores produtores de ágar extraído de espécies de *Gracilaria* são: Chile, Indonésia, Argentina, costa atlântica do Canadá, China, Vietnam e Namíbia (ALBA; KONTOGIORGOS, 2019).

A extensa costa brasileira entre as zonas de marés, com cerca de 8.500 km de extensão, é dominada pelas algas, entre macro e microalgas, cada uma das quais sendo consideradas fontes valiosas de diversos compostos bioativos, tais como polifenóis, carotenóides, pigmentos, enzimas e polissacarídeos (GIULIETTI *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2014). Segundo Farias (2004), o Estado do Ceará possui uma grande variedade de macroalgas marinhas com maior preponderância das algas vermelhas, da divisão *Rhodophyta* (205 espécies), seguida das algas verdes, divisão *Chlorophyta* (77 espécies) e das algas pardas ou marrons, divisão *Phaeophyta* (31 espécies), perfazendo um total de 313 espécies.

*Gracilaria birdiae* (Figura 1) é uma espécie de alga vermelha amplamente encontrada no território brasileiro, desde o Estado do Ceará até o Espírito Santo (PLASTINO; OLIVEIRA, 2002) e o seu gênero se encontra distribuído em todas as regiões tropicais do mundo (MARINHO-SORIANO; MOREIRA; CARNEIRO, 2006).

Figura 1 - Alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* (Escala: 2 cm)



Fonte: OLIVEIRA (2006)

O cultivo dessa espécie tem sido estimulado especialmente na região Nordeste do Brasil, onde está havendo a substituição gradual da exploração indiscriminada e insustentável de bancos naturais por comunidades costeiras sustentáveis (MIRANDA *et al.*, 2004;

CARDOZO *et al.*, 2007). A produção de exemplares de algas do gênero *Gracilaria* tem como principal objetivo a produção de ficocolóides que são usados como modificadores de textura em produtos alimentícios, particularmente em laticínios (URSI *et al.*, 2013).

Essas algas marinhas são fontes de uma variedade de compostos nutritivos, como carotenóides, vitaminas, minerais, ácidos graxos essenciais, proteínas e fibras alimentares (LORDAN; ROSS; STANTON, 2011), o que explica, em parte, seu consumo contínuo como alimento, não somente na Ásia, mas também em países ocidentais (HOTCHKISS; TRIUS, 2010).

Entre estes compostos, a fração solúvel da fibra alimentar das algas vermelhas contém carboidratos sulfatados, que foram descritos como compostos biologicamente ativos (AHMADI *et al.*, 2015). Estes são polissacarídeos de alto peso molecular que são denominados de ficocolóides

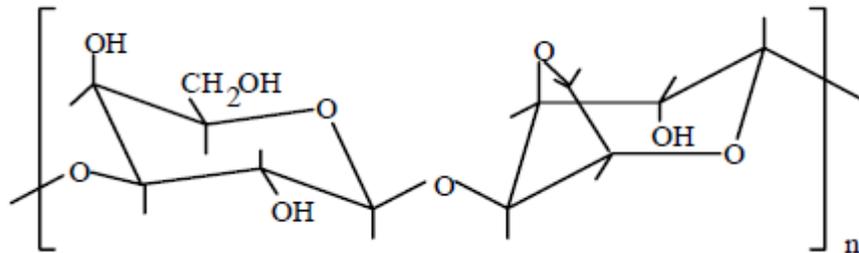
Nos Polissacarídeos Sulfatados (PS), alguns dos grupos hidroxila dos resíduos dos açúcares são substituídos por grupamentos sulfato (PÉREZ-RECALDE *et al.*, 2014). Os PS são macromoléculas complexas e heterogêneas dotadas de radical sulfato presentes em tecidos tanto de origem animal quanto de vegetal (BEZERRA NETO *et al.*, 2008). As algas marinhas são a fonte mais importante de PS de origem não animal (COSTA *et al.*, 2010). Os polissacarídeos extraídos de algas marinhas são substâncias naturalmente ativas e possuem importantes aplicações.

Os ficocolóides agaranas (ou simplesmente ágar) e carragenana são polissacarídeos sulfatados bem conhecidos por terem vasta aplicação na indústria alimentícia (como agentes gelificantes e espessantes), farmacêutica e biotecnológica. A principal diferença entre as carragenanas altamente sulfatadas, dos menos sulfatados como os PS do ágar está na estereoquímica de suas moléculas. A carragenana possui a D-galactose e anidro-D-galactose e no ágar tem-se a D-galactose, L-galactose ou anidro-L-galactose (CUNHA, DE PAULA; FEITOSA, 2009; FERREIRA, 2011; GÓMEZ-ORDÓÑEZ; RUPÉREZ, 2011).

Em relação ao ágar, ele é considerado um polissacarídeo fibroso extraído de algas marinhas vermelhas chamadas agarófitas (divisão *Rhodophyta*), como *Gelidium* sp. e *Gracilaria* sp., consistindo em uma mistura de agarose e agarpectina, sendo a agarose o principal componente do ágar, representando aproximadamente 70% (m/m) do total de sua composição; é ligeiramente ramificado e sulfatado (RHIM; LEE; HONG; 2011). O ágar é um polímero natural da classe dos poligalactanos (SOUZA, 2008). A agarose é um polissacarídeo neutro com uma estrutura linear de unidades repetitivas do dissacarídeo agarobiose (dímero constituído de D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose) (Figura 2) e a agarpectina é um

polissacarídeo sulfatado, composto por agarose com grupos éster sulfatos, ácido pirúvico e ácido D-glucurônico (ARVIZU-HIGUERA *et al.*, 2007).

Figura 2 – Estrutura química da agarose



Fonte: GARCIA; VIDAL, 2000.

Em água fria, o ágar é insolúvel, porém se expande consideravelmente absorvendo grande quantidade de água. Em água quente, porém, a dissolução é rápida formando um gel firme. Suas propriedades de baixa viscosidade (em solução), elevada transparência, temperaturas de fusão/gelificação bem definidas (SOUZA, 2008) fazem com que o ágar apresente larga aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética, biotecnológica, têxtil e de papel, como agente gelificante, espessante e estabilizante (YOSHIMURA, 2006).

Semelhantes a outras matérias prima as quais se obtém polissacarídeos, os extraídos de algas marinhas são considerados uma fonte barata e bastante abundante (HOLDT; KRAAN, 2011) e embora o interesse pelo potencial biotecnológico dos polissacarídeos de algas marinhas ainda seja recente, várias pesquisas já foram realizadas na elaboração de filmes comestíveis de PS (ágar e carragena) e estes apresentaram boas propriedades mecânicas e de barreira (HUQ, et al., 2012; GADE; TULASI; BHAI; 2013).

Na aplicação em filmes comestíveis o ágar tende a apresentar algumas características interessantes como uma alta resistência mecânica e boa flexibilidade em filmes, o que torna interessante sua aplicação como matéria prima na elaboração de embalagens para alimentos (KESTER; FENNEMA, 1986; FREILE-PELEGRÍN, *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2009; VEJDAN *et al.*, 2016; MOHAJER *et al.*, 2017).

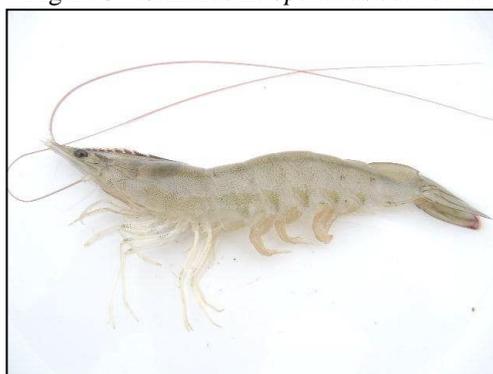
Dentre as técnicas mais convencionais na preservação de pescados pode-se citar o resfriamento para manter a qualidade e prolongar a vida de prateleira dos mesmos (WANG *et al.*, 2018). Entretanto tal técnica não minimiza de forma eficiente os processos de deterioração (ARANCIBIA *et al.*, 2015). Assim, os filmes e revestimentos comestíveis podem ser

utilizados como uma excelente alternativa para aumentar a vida de prateleira de pescados (FARAJZADEH *et al.*, 2016).

## 2.5 Camarão

O camarão marinho é um importante recurso pesqueiro encontrado em todos os mares do mundo, desde regiões de latitude subpolar até regiões subtropicais, onde sua incidência é maior. Nos trópicos são encontradas espécies de alto valor econômico, com áreas de pesca de grande produtividade e produção (LAVILLA-PITOGO; LEAÑO; PANER, 1998). Uma das espécies de camarão de grande valor comercial, natural do Oceano Pacífico, e que foi adaptada no Brasil é *Litopenaeus vannamei* (MARTINS, 2003) (Figura 3).

Figura 3 - Camarão *Litopenaeus vannamei*



Fonte: RIBEIRO, 2013.

O Camarão *L. vannamei* é uma espécie encontrada naturalmente desde a porção leste do oceano Pacífico, na altura de Sonora, México, até a altura de Thumbes, norte do Peru. O animal é uma espécie marinha, com preferência pelo sedimento, sendo encontrada desde a região de infra-litoral, até profundidades de 72 m, e seu tamanho pode chegar a 23 cm. É a espécie comercial mais explorada no sul do México, Guatemala e El Salvador e a espécie mais cultivada no Hemisfério Ocidental (YUAN *et al.*, 2016).

*L. vannamei* é um crustáceo decápodo, pertencente à família Penaeidae (HUNER; BROWN, 1985). Segundo Blaxter; Southward; Tyler (1999), os membros dessa família apresentam um ciclo de vida semelhante, com desenvolvimento de estágios: larvar (náuplio), protozoos, mísis, pós-larvar, juvenil e adulto. As diferenças estão relacionadas com a preferência das pós-larvas, juvenis e adultos por determinadas áreas durante seu ciclo de desenvolvimento.

A espécie *L. vannamei*, apresenta uma capacidade extraordinária de adaptar-se a uma variedade de condições das áreas costeiras tropicais e semitropicais dos continentes, sendo a primeira que se adaptou, com produção comercial, as águas de baixa salinidade ou oligohalinas, não somente no Nordeste do Brasil, mas em diversos países do Sudoeste da Ásia, que é atualmente o centro mundial produtor de camarão por excelência (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE CAMARÃO, 2015).

Devido sua importância para a aquicultura e a excelente qualidade da carne (destacando-se seu sabor característico, firmeza e coloração), o *L. vannamei* tornou-se uma espécie bem conhecida e aceita no mercado internacional. Em função disso, o cultivo dessa espécie vem despertando um interesse crescente nos investidores e produtores de grande parte da América do Sul, Central e até da China (LIU *et al.*, 2004).

No Brasil, o *L. vananmei* é uma espécie comercialmente cultivada e foi introduzida no país em 1983. Entretanto, somente a partir do início dos anos 90, quando alguns laboratórios de larvicultura privada viabilizaram pós-larvas dessa espécie é que as validações tecnológicas realizadas pelas fazendas de camarão, nos Estados do Rio Grande do Norte, Ceará e Paraíba, demonstraram a supremacia de *L. vannamei* em relação às espécies nativas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE CAMARÃO, 2004). Atualmente o Estado do Ceará, é o principal representante do país, sendo responsável por quase metade da totalidade da produção nacional de camarão (ANUÁRIO BRASILEIRO DA PESCA E AQUICULTURA, 2014).

A necessidade de um conhecimento básico sobre a avaliação da qualidade desse camarão cultivado, e seu armazenamento sob refrigeração após a colheita, aumentou com a ascensão na aqüicultura e a comercialização da espécie (LALITHA; SURENDRAN, 2006). O camarão, por ser considerado um produto de elevado consumo e com significativa importância econômica no Estado do Ceará, necessita de pesquisas que monitorem a sua qualidade e por ventura revelem possíveis fatores que ponham em risco a saúde pública.

É imprescindível, portanto, a utilização de meios que levem a uma boa qualidade final do produto, principalmente quando se relacionam pré-requisitos essenciais como higiene e temperatura em toda a cadeia de processamento de pescado. Por isso, a realização de pesquisas que tenham como objetivo aumentar a vida de prateleira do pescado torna-se cada vez mais relevante (VIEIRA, 2006).

Já existem alguns estudos publicados sobre a possibilidade de se utilizar filmes e/ou revestimentos comestíveis biodegradáveis para prolongar a vida útil do camarão fresco (ARANCIBIA *et al.*, 2014; FARAJZADEH *et al.*, 2016; KAKAEI; SHAHBAZI, 2016;

SILVA, 2018). Essas pesquisas foram realizadas com outro biopolímero, o polissacarídeo quitosana e diante desse contexto torna-se de suma relevância pesquisar a utilização de polissacarídeos extraídos de algas marinhas para a aplicação de filmes e/ou revestimentos comestíveis em pescados.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia do Pescado (LATEPE), integrante do Departamento de Engenharia de Pesca, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará (Campus do Pici, Fortaleza, Ceará) e com parceria da Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (EMPRAPA).

#### 3.1 Material biológico

##### 3.1.1 Obtenção dos exemplares da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae*.

A alga marinha foi coletada em uma estação de cultivo em mar aberto na praia de Fleixeiras, localizada no município de Trairi, Ceará. O número de cadastro desta alga no Sisgen é AE7BAB9. Os exemplares da *G. birdiae* foram acondicionados em sacos plásticos e em seguida, conduzidos ao Laboratório de Tecnologia do Pescado (Latepe), pertencente ao Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará (UFC), localizado no Campus do Pici, Fortaleza, Ceará.

Após a chegada ao laboratório, o material coletado foi lavado com água destilada, separado de organismos incrustantes e secado em papel filtro em temperatura ambiente. Posteriormente foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a extração dos polissacarídeos.

##### 3.1.2 Obtenção dos exemplares de camarão *Litopenaeus vannamei*

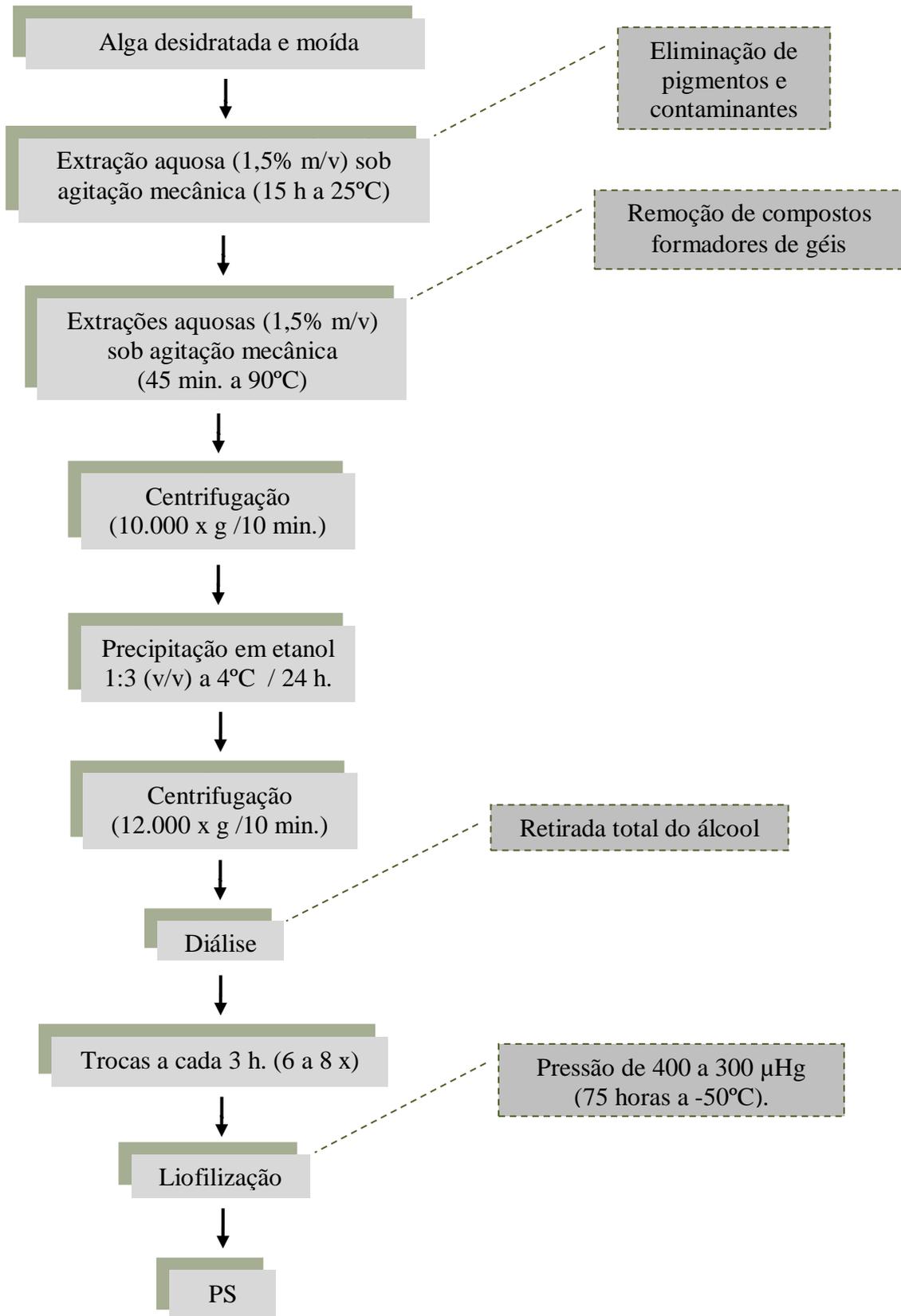
Foram adquiridos três quilos de camarão descascado e sem cabeça, mantidos a uma temperatura de  $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . O número de cadastro desta espécie no Sisgen é A058F53. Os exemplares de camarão apresentaram um peso médio de sete gramas e foram obtidos em uma peixaria localizada do município de Fortaleza, Ceará. Os camarões foram acondicionados em caixas isotérmicas com gelo e em seguida foram transportados ao Laboratório de Tecnologia do Pescado (Latepe) do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará. No laboratório, as amostras de camarão foram separadas em lotes e logo em seguida foram armazenadas em um freezer (Brastemp *Frost Free*) a  $-18 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  até o momento da aplicação dos revestimentos.

### 3.2 Processo de extração do polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria birdiae*.

O processamento de extração dos polissacarídeos iniciou-se com o descongelamento da alga, seguido da secagem em estufa de circulação de ar a 25°C. A moagem foi feita em um moinho de faca (Tecnal – Wiley TE-650/1) até a obtenção de um pó seco onde o qual foi submetido às posteriores extrações.

As algas desidratadas e moídas foram submetidas à extração aquosa sob agitação mecânica (1,5% m/v), à temperatura de 25°C durante 15 horas, segundo Melo *et al.*, (2008). Esta etapa foi importante para eliminação de pigmentos e contaminantes.

A massa de alga da primeira extração foi sequencialmente submetida a extrações aquosas a 90°C (1,5% m/v) em banho-maria (microproce SSADO - modelo 0215M2 -Quimis) durante 45 minutos para a remoção de compostos formadores de géis (SOUZA *et al.*, 2012). Após esta etapa, os extratos aquosos foram centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram precipitados em etanol na proporção de 1:3 (v/v) por 24 h a 4 °C. Após esse período os precipitados foram centrifugados a 12.000 x g por 10 minutos. Para a retirada total do álcool, o polímero passou pelo processo de diálise em membranas de celulose (Sigma-Aldrich, 76 mm) em água destilada no volume de 2,5 litros com trocas a cada três horas, de seis a oito vezes. Após a diálise, o PS foi colocado em liofilizador (Líotop, Serie; 39413, Brasil) a uma pressão entre 400 a 300 µHg, em temperatura de -50°C por 75 horas de acordo com a Figura 3.

Figura 4 - Fluxograma do processo de extração do polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria birdiae*

### 3.3 - Caracterização do polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria birdiae*

#### 3.3.1 Composição química do polissacarídeo

##### 3.3.1.1 Determinação do conteúdo de sulfato

O teor de sulfato foi determinado segundo Dodgson; Price, 1962), tendo como reagente a mistura gelatina-bário. Após hidrólise das amostras com HCl 1 M por 5 horas a 105°C, os reativos (TCA 3%, mistura gelatina-bário) foram adicionados. Nesse método, o sulfato complexiona-se com o bário, formando sulfato de bário (sal insolúvel), sendo que a gelatina está presente para manter em suspensão, ou aumentar o tempo de sedimentação do sal formado. A sensibilidade do método está na faixa de 20 – 200 µg de sulfato, a leitura da absorbância foi realizada em 360 nm e utilizou-se como padrão sulfato de sódio na concentração de um mg/mL.

##### 3.3.1.2 Determinação do conteúdo de carboidrato

O teor de carboidrato nas frações foi determinado utilizando-se a técnica de Dubois *et al.* (1956). A um mL da amostra previamente diluída foi adicionado um mL de fenol a 5% e cinco mL de ácido sulfúrico concentrado e, após agitação, a mistura permaneceu em repouso por 15 minutos seguida por leitura em espectrofotômetro a 490 nm.

A concentração de carboidratos foi estimada com relação a uma curva padrão utilizando-se galactose.

##### 3.3.1.3 Determinação do conteúdo de proteína

As concentrações de proteínas contaminantes dos PS foram realizadas segundo o método de Bradford (1976) e utilizou-se Albumina Sérica Bovina (BSA) como padrão e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm.

### **3.4 Degradação térmica do polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria birdiae***

#### **3.4.1 Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**

Diferentes técnicas têm sido utilizadas para estudar o processo de polimerização de polímeros, tais como, RMN, DCS, TGA, IV, LS. Entre estas técnicas, a mais utilizada na avaliação da cinética de reação é a análise térmica. A análise térmica inclui várias técnicas, através das quais as propriedades de um material podem ser determinadas em função do tempo ou da temperatura. Dentre as técnicas de análise térmica, a calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma das técnicas mais utilizadas para acompanhar a evolução dos processos exotérmicos, permitindo determinar parâmetros termodinâmicos e cinéticos resultantes do processo de polimerização, tais como, calor (entalpia) de reação, energia de ativação, constante de velocidade, ordem e velocidade de reação. No estudo do comportamento cinético por DSC, pode-se observar o perfil da curva exotérmica resultante do processo de polimerização de um sistema, possibilitando determinar a melhor temperatura ou condições de formulação dos compósitos (MARTINI, 2010).

Na análise de DSC, a amostra e o material de referência são mantidos à mesma temperatura durante o programa térmico, onde a temperatura é controlada rigorosamente. A análise de DSC para o PS foi realizada utilizando-se um equipamento da TA INSTRUMENT (modelo Q20) sob atmosfera de nitrogênio, com fluxo constante de 50 mL.min<sup>-1</sup> a partir de 5,1 mg da amostra em pó, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, na faixa de temperatura de 0 a 400°C.

#### **3.4.2 Análise Termogravimétrica (TGA)**

É uma técnica na qual se monitora a variação da massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo em um ambiente de temperatura e atmosfera controladas. Seu princípio baseia-se em analisar a perda ou a agregação de massa da amostra em temperaturas variadas.

A análise termogravimétrica (TGA) do PS foi realizada utilizando-se um equipamento da Perkin Elmer (STA 6000) sob atmosfera de nitrogênio, com fluxo constante de 50 mL.min<sup>-1</sup>. A partir de aproximadamente 18,49 mg das amostras em pó, com taxa de aquecimento de 10°C/min, na faixa de temperatura de 25° a 600°C.

### **3.5 Análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).**

A espectroscopia de infravermelho é um tipo de espectroscopia de absorção a qual usa a região do infravermelho do espectro eletromagnético. Ela pode ser usada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra. Tal fato se baseia em que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (níveis vibracionais). Assim podem vibrar de seis modos: estiramentos simétricos e assimétricos e deformações angulares, tais como, tesoura, torção, balanço e rotação (VALE, 2017).

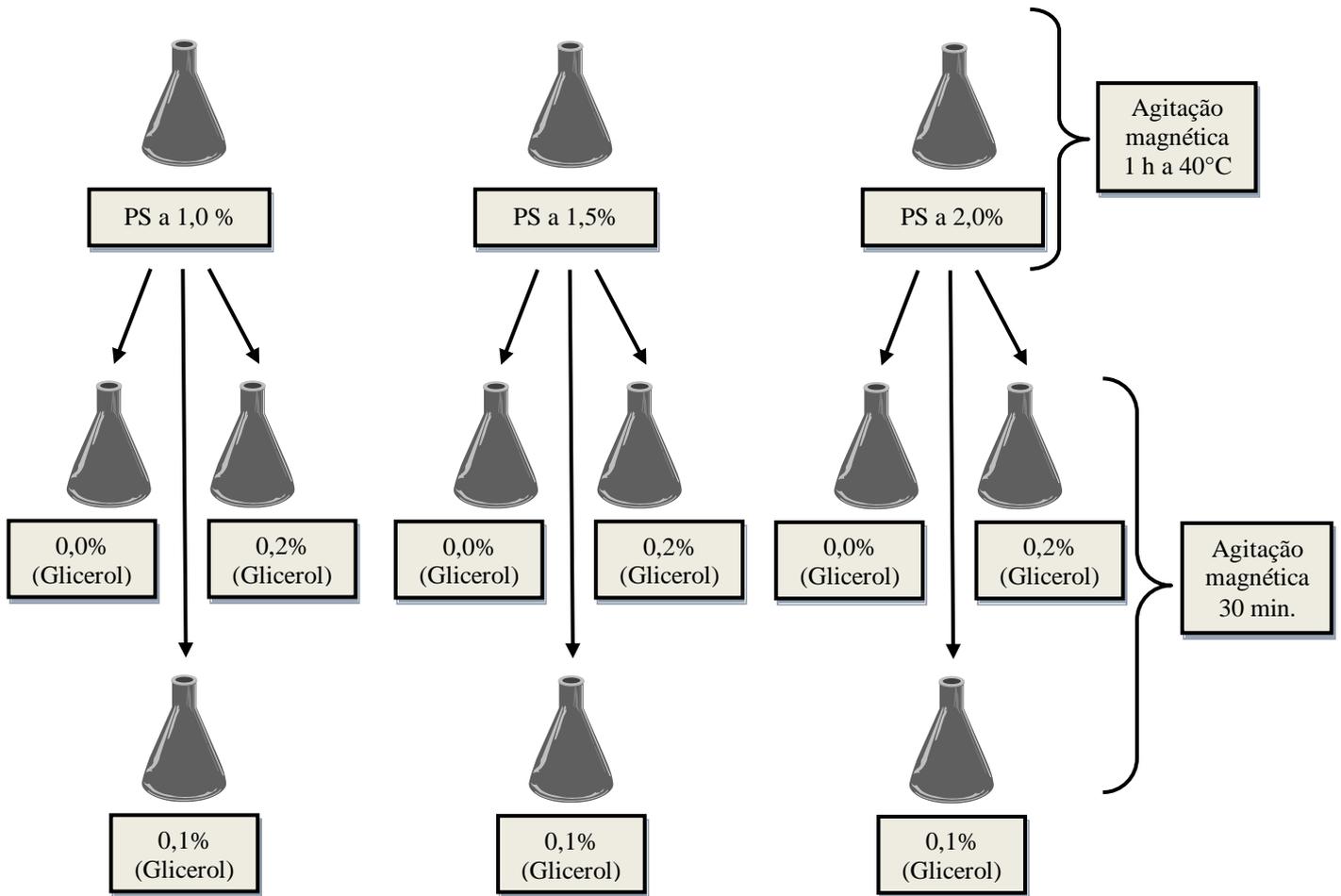
A análise foi feita em ATR (a amostra seca e em pó foi misturada com brometo de potássio e prensada em pastilhas) no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria tropical em espectrofotômetro de marca Varian (modelo FT-IR) na faixa de comprimento entre 400 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.6 Produção e Caracterização dos filmes de polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria birdiae***

#### ***3.6.1 Preparo das soluções dos filmes e revestimentos comestíveis.***

Tanto os filmes como os revestimentos comestíveis foram preparados de acordo com a metodologia proposta por Souza *et al.* (2010) com adaptações de Vásconez *et al.*, (2009). Inicialmente foram preparadas três soluções de PS com as seguintes concentrações: 1,0; 1,5 e 2,0% (m/v). As três soluções foram agitadas separadamente em um agitador magnético por uma hora a 40 °C. Posteriormente as soluções foram divididas em volumes equivalentes e em seguida adicionou-se glicerol em três concentrações diferentes, que foram respectivamente, 0,0; 0,1 e 0,2% (m/v). Todas as soluções ficaram sobre agitação magnética por 30 minutos, gerando nove soluções filmogênicas de acordo com a Figura 5.

Figura 5 - Fluxograma do preparo das soluções dos filmes e revestimentos comestíveis de polissacarídeo sulfatado extraído da *Gracilaria birdiae*



FONTE: AUTOR (2019).

Os filmes comestíveis foram produzidos através da técnica de *casting* (ou evaporação do solvente), de acordo com SOUZA *et al.* (2010) com adaptações. Foram vertidos em cada placa de Petri de nove cm de diâmetro, 28 mL de cada solução filmogênica de PS com as seguintes concentrações: 1,0; 1,5 e 2,0% (m/v) e em cada solução foram adicionadas três diferentes concentrações de glicerol: 0,0; 0,1 e 0,2% (v/v). Em seguida, as soluções filmogênicas foram colocadas em estufa de circulação a 35°C por 24 horas.

Depois de secas as amostras foram acondicionadas em um dessecador contendo sílica, com umidade relativa de 10% a uma temperatura de 25°C.

### 3.7 Propriedades físicas dos filmes comestíveis de polissacarídeo sulfatado extraído da *Gracilaria birdiae*

#### 3.7.1. Permeabilidade ao vapor de água

A determinação da permeabilidade do vapor de água (PVA) foi realizada por gravimetria baseada no método da ASTM-D-3985-02 (2002) com modificações. O filme testado foi selado no topo de uma célula de permeação (FIGURA 6) contendo água destilada (100% UR; 2337 Pa, pressão de vapor a 20°C), colocado num dessecador a 25°C e 10% UR contendo sílica gel. A medição foi determinada através da perda da transferência da água do interior da célula para a sílica presente no dessecador. As células foram pesadas em intervalos de 2 horas durante 8 horas. 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 dentro do dessecador. A inclinação da curva que representa a perda de peso em função do tempo foi obtida por regressão linear. A medida (PVA) dos filmes foi determinada da seguinte maneira:

$$PVA = (WVTR \times L) / \Delta P$$

Onde WVTR é a taxa de transmissão de vapor de água ( $\text{g} \times \text{m}^{-2}\text{h}^{-1}$ ) medida através do filme (calculado a partir da inclinação da curva dividida pela área do filme), L é a espessura média do filme (m) e  $\Delta P$  é a diferença de pressão parcial de vapor da água (atm) nos dois lados do filme. Para cada tipo de filme foram realizadas três repetições. A espessura de cada amostra foi medida utilizando-se um micrômetro digital (Digimess, São Paulo, Brasil), em nove diferentes posições de cada amostra avaliada. Os valores médios foram utilizados para calcular a permeabilidade ao vapor de água.

Figura 6: Célula de permeação para determinação da PVA



FONTE: AUTOR (2019)

### 3.7.2 Solubilidade em água

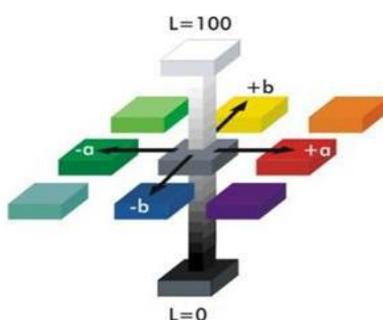
A solubilidade é definida como a porcentagem da matéria seca do filme após 24 h de imersão em água destilada (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992). A matéria seca inicial dos filmes foi determinada por secagem de discos com 2 cm de diâmetro em uma estufa, a 100 °C, durante 24 h. Após este período, os discos foram pesados e imersos em 50 mL de água destilada, com agitação periódica de 82 rpm através de uma mesa agitadora orbital SL 180 (marca SOLAB), por 24 h a 25 °C. Finalmente, os filmes foram retirados e secos a 100 °C por 24 h para determinar a matéria seca final. A solubilidade foi expressa como sendo a diferença entre a matéria seca inicial e final em relação à matéria seca inicial. Os testes foram realizados em triplicata.

### 3.7.3 Cor e Opacidade

A cor dos filmes foi determinada com um colorímetro Minolta (CR 400, Minolta, Japão). Uma placa de cor branca foi usada como um padrão de calibração e como uma base para as medições de cor dos filmes. Os valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  de cada filme foram avaliados pela medidas de reflectância.

A opacidade dos filmes foi determinada usando um medidor de cor e de acordo com a escala de cores Hunterlab. Seguindo este método, a opacidade ( $Y$ ) foi calculada como a razão entre a opacidade de cada amostra sobre o padrão preto ( $Y_b$ ) e a opacidade de cada amostra no padrão branco ( $Y_w$ ). De três repetições de cada amostra de filme foram determinados aleatoriamente três  $Y_b$  e  $Y_w$  e a média deles foi utilizada para a realização dos cálculos. Os resultados foram expressos em porcentagem:  $Y (\%) = 100 (Y_b/Y_w)$ .

Figura 7 - Sistema para cor através do método de Hunter



Fonte: HUNTERLAB

### **3.8 Propriedades mecânicas**

Os ensaios de tração (tensão máxima de ruptura e deformação na ruptura) para caracterização mecânica dos filmes foram realizados no Laboratório de Tecnologia da Biomassa da EMBRAPA Agroindústria Tropical, Fortaleza – CE, seguindo as orientações da ASTM-D-882-91 (1991).

#### ***3.8.1 Corpos de prova***

Os corpos de prova utilizados para os ensaios mecânicos foram cortados por uma prensa estampadora pneumática marca CEAST cuja pressão de operação utilizada foi de sete bar.

#### ***3.8.2 Ensaio de tração***

Os filmes antes da realização do teste foram acondicionados em um dessecador contendo nitrato de magnésio hexahidratado ( $Mg(NO_3)_2 \times 6H_2O$ ) para mantê-los em um ambiente com umidade relativa e temperatura em torno de  $50 \pm 5\%$  e  $24 \pm 2^\circ C$ , respectivamente, por no mínimo 40 horas. Nos ensaios de tração, os corpos de prova com comprimento de 63,24 mm e largura de 12,86 mm foram afixados por meio de garras acopladas a uma travessa móvel da Máquina Universal de Ensaio, seguindo as orientações da ASTM-D-882-91 (1991).

A taxa de deformação de tração é controlada pelo mecanismo de direcionamento, enquanto a tensão de tração sustentada pela amostra é registrada pela célula de carga, ambos acoplados à travessa fixa. O equipamento utilizado para análise foi o EMIC, com uma célula de carga de 100 N. A velocidade de tracionamento utilizada foi de 50 mm/min, sendo a distância inicial entre as garras de 30 mm.

A tensão máxima de ruptura foi expressa em MPa e calculada dividindo a força máxima (N) necessária para romper o corpo de prova pela área inicial transversal ( $m^2$ ) da amostra. A deformação na ruptura foi calculada como sendo a razão entre o comprimento final no ponto de ruptura da amostra pelo comprimento inicial da amostra (30 mm) e expressa em porcentagem. Os ensaios foram realizados em quintuplicatas para cada amostra.

### 3.9 Molhabilidade dos revestimentos de polissacarídeo sulfatado em camarão.

As soluções de revestimento de PS foram elaboradas conforme o item 3.6.1 de acordo com a Figura 5 para determinação da capacidade molhante (através do ângulo de contato) nos exemplares de camarão descascados e sem cabeça.

O ângulo de contato ( $\theta$ ) foi medido através do medidor de ângulo de contato GBX *Instrumentation Scientifique* acoplado a uma câmera Pixelink Nikon com sistema de análise de imagens, operado em atmosfera e temperatura ambiente. Para análise os exemplares de camarão *L. vannamei* foram cortados em forma retangular com um auxílio de bisturi e colocados em uma placa de Petri. Logo em seguida, cada solução de revestimento foi colocada em uma seringa de vidro de um mL (Fortuna® Optima) com um diâmetro da agulha de 0,815 mm determinado com um micrômetro digital 0-0,25mm (Mitutoyo, Japan) com precisão de 0,0001 mm. Doze repetições de ângulo de contato foram obtidas a  $20,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

A tensão superficial dos revestimentos do PS foi medida através de um tensiômetro analógico que se baseou no método do anel DuNoüy. Primeiro houve a calibração do aparelho com uma tensão superficial conhecida através da água ultrapura que é de 72 mN/m e posteriormente foram medidas as tensões superficiais das soluções de revestimento.

#### 3.9.1 Tensão superficial crítica

Antes de analisar a capacidade molhante dos revestimentos de PS nos exemplares de camarão descascados e sem cabeça, foi necessário determinar a tensão superficial de acordo Zisman (1964), que desenvolveu o método prático que visa caracterizar a capacidade molhante em superfícies sólidas.

O sistema se baseia na observação de uma superfície com uma tensão inferior a 100 mN/m, sendo classificada como uma superfície de baixa energia. A capacidade molhante é aplicada em superfície sólida que tenha a característica de baixa energia, portanto tornou-se necessária a determinação da energia da superfície nos exemplares de camarão descascados e sem cabeça.

De acordo com Zisman (1964), sistemas em que a tensão superficial é inferior a 100 mN/m (superfícies de baixa energia), uma gota em superfície sólida será uma função linear da tensão superficial do líquido.

Para um líquido puro, se interações polares ( $\gamma_L^p$ ) e dispersivas ( $\gamma_L^d$ ) são conhecidas e se teta ( $\theta$ ) é o ângulo de contato entre este líquido e um sólido, essas interações podem ser descritas em termos por trabalho reversível de adesão ( $W_a$ ) de acordo com Zisman:

$$W_a = W_a^d + W_a^p \leftrightarrow W_a = 2 \times (\sqrt{\gamma_s^d \times \gamma_L^d} + \sqrt{\gamma_s^p \times \gamma_L^p}) \quad \text{Eq. (4)}$$

onde  $\gamma_s^p$  e  $\gamma_s^d$  são as contribuições polares e dispersivas do sólido a ser estudado.

Reorganizando a Eq. (5), obtém-se:

$$\frac{1 + \cos\theta}{2} \times \frac{\gamma_L}{\sqrt{\gamma_L^d}} = \sqrt{\gamma_s^p} \times \sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}} + \sqrt{\gamma_s^d} \quad \text{Eq. (5)}$$

Foi calculado o ângulo de contato de três compostos puros, formamida (marca VETEC, 95%), tolueno (marca VETEC, 99,5%) e água ultrapura, na superfície dos exemplares de camarão descascados e sem cabeça, combinados com suas componentes polares e dispersivas que permitiram calcular tanto a variável dependente (equação 6) quanto a variável independente (equação 7) de acordo com a equação 4.

$$\left( \frac{1 + \cos\theta}{2} \times \frac{\gamma_L}{\sqrt{\gamma_L^d}} \right) \text{Eq. (6)} \quad \text{e} \quad \left( \sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}} \right) \text{Eq. (7)}.$$

A estimativa da tensão superficial crítica ( $\gamma_c$ ) foi realizada a partir da extrapolação gráfica de Zisman. Os gráficos de Zisman apresentam o objetivo de caracterizar a molhabilidade de superfícies de baixa energia. O gráfico de Zisman (1964) é obtido traçando o cosseno do ângulo de contato de líquidos puros sobre a superfície sólida a ser estudada contra a tensão de superfície de uma mesma série de líquidos. A interceptação destas curvas com o  $\cos\theta = 1$  é conhecida como a tensão superficial crítica ( $\gamma_c$ ). A tensão de superfície crítica é um ponto imaginário do valor  $\gamma_{sv}$  e é frequentemente utilizado para descrever a capacidade de umedecimento de uma superfície. Ela representa o valor de um líquido  $\gamma_{LV}$  acima da qual a molhabilidade deste líquido em uma superfície sólida é completa. A tensão superficial crítica é definida pela equação (8).

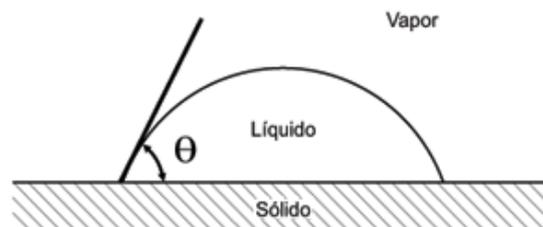
$$\gamma_C = \lim_{\theta \rightarrow 0} \gamma_{LV}, \text{ onde } \theta \rightarrow 0 \quad \text{Eq. (8).}$$

### 3.9.2 Capacidade molhante

A molhabilidade foi avaliada pela determinação dos valores do coeficiente de espalhamento ( $W_s$ ) e dos trabalhos de adesão ( $W_a$ ) e coesão ( $W_c$ ). As forças de adesão promovem o espalhamento do líquido na superfície sólida e as forças coesivas promovem a contração do fluido. O comportamento molhante das soluções depende principalmente do equilíbrio destas forças.

A tensão superficial da solução de revestimento foi medida pelo método da gota pendente utilizando a aproximação de Laplace-Young (SONG; SPRINGER, 1996). O ângulo de contato ( $\theta$ ) de uma gota de líquido na superfície sólida é definido pelo equilíbrio mecânico da gota sob a ação de três tensões interfaciais: sólido-vapor ( $\gamma_{sv}$ ), sólido-líquido ( $\gamma_{sl}$ ) e líquido-vapor ( $\gamma_{lv}$ ). A Figura 8 ilustra o esquema representativo das tensões interfaciais da gota de um líquido na superfície sólida.

Figura 8 – Esquema representativo das três tensões interfaciais da gota de um líquido na superfície sólida



Fonte: WOLF; SANTOS; PHILIPPI, 2006.

O coeficiente de equilíbrio de espalhamento ( $W_s$ ) é definido pela Eq. 9 (RULON; ROBERT, 1995) e apenas poderá ser negativo ou zero.

$$W_s = W_a - W_c = \gamma_s - \gamma_{LV} - \gamma_{SL} \quad \text{Eq. (9),}$$

onde  $W_a$  e  $W_c$  são os trabalhos de adesão e coesão, definidos pelas Equações. (9) e (10), respectivamente:

$$W_a = \gamma_{L v} + \gamma_{S v} - \gamma_{S L} \quad \text{Eq. (9)}$$

$$W_C = 2 \times \gamma_{L v} \quad \text{Eq. (10)}$$

O ângulo de contato ( $\theta$ ) e a tensão superficial líquido-vapor ( $\gamma_{LV}$ ) foram medidos por um medidor de ângulo de contato GBX *Instrumentation Scientifique* acoplado a uma câmera Pixelink Nikon com sistema de análise de imagens, operado em atmosfera e em temperatura ambiente. As amostras de revestimento foram colocadas em uma seringa de 500  $\mu\text{L}$  (Hamilton, Estados Unidos) com uma agulha de 0,75 mm de diâmetro. O ângulo de contato dos exemplares de camarão foi medido pelo método da gota séssil (KWOK; NEWMAN, 1999). As medições foram realizadas em menos de 30 s. Dez repetições de medidas de tensão superficial e do ângulo de contato foram obtidas a  $20,0 \pm 0,5$  °C.

A solução que mais aproximou-se de zero foi escolhida para a aplicação como revestimento nos exemplares do camarão *L. vannamei* descascados e sem cabeça.

### **3.10 Avaliação da atividade antimicrobiana da solução filmogênica de polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria birdiae*.**

#### **3.10.1 Bactérias-teste**

A avaliação da atividade antimicrobiana da solução filmogênica do PS a 1,0%, foi realizada frente a quatro cepas padrões: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ATCC 13076 e *Vibrio parahaemolyticus* IOC 18950. As cepas foram crescidas em ágar de soja trípitca (TSA) e, para o caso específico de *Vibrio parahaemolyticus*, foi adicionado 1% (p/v) de NaCl na composição do TSA. As cepas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 h.

##### **3.10.1.1 Preparo dos inóculos bacterianos**

Das culturas crescidas em TSA a 35 °C por 24 h, foi retirada uma porção do inóculo e homogeneizada em nove mL de solução salina 0,85% de cloreto de sódio (p/v) para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e nove mL de solução salina 1,0% de cloreto de sódio (p/v) (Vetec) para *Vibrio parahaemolyticus* até se obter uma

turvação equivalente à turbidez 0,5 na escala de *McFarland*. A absorvância foi aferida em espectrofotômetro (Micronal), sendo considerado o intervalo entre 0,08 e 0,10 em um comprimento de onda de 625 nm. A turbidez óptica comparável à solução padrão 0,5 de *McFarland* equivale a uma suspensão contendo, aproximadamente,  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC / mL) (CLSI, 2013).

Cada bactéria-teste, com concentração do inóculo ajustada, foi inoculada, em duplicata, em placas contendo ágar Mueller-Hinton sem adição de NaCl para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e com adição de 1% de NaCl (p/v) para *Vibrio parahaemolyticus*, com auxílio de um *swab* de algodão estéril (CLSI, 2013).

Em cada placa com o meio de cultura inoculado com a bactéria-teste, foram perfurados quatro poços de seis mm de diâmetro com o auxílio de um perfurador de inox esterilizado (BALOUIRI *et al.*, 2016). Nos poços foi adicionada uma alíquota de 50 µL da solução filmogênica do PS na concentração de 1,0% e, no segundo poço, o mesmo volume de água destilada estéril. Logo após, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 48 h.

Após o período de incubação, cada placa foi conferida para avaliação da atividade antimicrobiana do PS. A presença de um halo transparente ao redor dos poços confirmaria o resultado qualitativo positivo da ação antimicrobiana do PS a 1,0%.

### **3.11 Elaboração das soluções filmogênicas de polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria birdiae*.**

A solução filmogênica adotada foi a de 1,0% (m/v) de PS com 0,0% (v/v) de glicerol. A adoção foi baseada no valor do coeficiente de molhabilidade. Essa solução permaneceu sob agitação magnética a 40°C por uma hora. Após a completa diluição, a solução foi acondicionada em uma capela de fluxo laminar (Pachane, modelo Pa40) e submetida à esterilização em luz ultravioleta por 30 minutos.

### **3.12 Aplicação do revestimento obtido do polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria birdiae* em exemplares de camarão *Litopenaeus vannamei* congelados, descascados e sem cabeça.**

No total, foram elaborados três tratamentos para os exemplares de camarão congelados (descascados e sem cabeça): Camarão Sem Revestimento (CSR), que serviu como

controle para o experimento; Camarão Glaceado (CG) e Camarão Revestido com Polissacarídeo Sulfatado (CRPS). Foram feitas sete análises, a partir do dia zero até os 180 dias de armazenamento a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em intervalos de trinta dias.

Para a perda de peso, perda de glaciamento e perda de revestimento de PS foram separadas cinco unidades de camarão para cada análise.

### ***3.12.1 Aplicação da solução filmogênica de PS a 1,0% em exemplares do camarão *Litopenaeus vannamei* congelados, descascados e sem cabeça.***

Os exemplares de camarão foram submetidos à aplicação da solução de revestimento pela técnica de imersão. O método consistiu na imersão das amostras de camarão congelado na solução de revestimento a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após a aplicação foi feita uma drenagem em peneira de malha de aço inoxidável por 20 segundos e em seguida, os exemplares de camarão foram acondicionados em bandeja de isopor e envolvidos em filme plástico e etiquetados. Para o glaciamento, os exemplares de camarão foram submetidos a imersão em água estéril a  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20 segundos. Após a imersão foi feita uma drenagem em peneira de malha de aço inoxidável por 20 segundos e em seguida, os exemplares de camarão foram acondicionados em bandeja de isopor, envolvidas em filme plástico e etiquetados. Em seguida as amostras oriundas dos três tratamentos foram armazenadas em um Freezer (Brastemp Frost Free) a temperatura  $-18 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  durante 180 dias.

## **3.13 Análises das perda de peso, de glaciamento e de revestimento**

As perdas de peso, de revestimento e de glaciamento das amostras foram determinadas de acordo com Soares *et al.*, (2015).

### ***3.13.1 Perda de peso***

Para a determinação da perda de peso foram separadas cinco unidades de camarão não revestido. Os exemplares de camarão foram pesados antes de serem congelados ( $W_1$ ) e após o congelamento ( $W_2$ ) durante os 180 dias de análises. O cálculo para perda de peso está de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Perda de peso} = W_2 - W_1 / W_1 \times 100 \quad \text{Eq. 11}$$

### 3.13.2 Perda de glaciamento

Para a determinação da perda de glaciamento foram separados cinco exemplares de camarão que foram glaceados a 4 °C; onde primeiro foi determinada a taxa de absorção do glaciamento com a pesagem após o glaciamento ( $W_6$ ) e após serem congeladas ( $W_7$ ) de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Capacidade de absorção do glaciamento} = W_7 - W_6 / W_7 \times 100 \quad \text{Eq. 12}$$

Para a determinação da perda de glaciamento, foram realizadas as pesagens de cinco exemplares de camarão revestidos ( $W_8$ ) a cada 30 dias de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Perda de glaciamento} = W_8 - W_7 / W_7 - W_6 \times 100 \quad \text{Eq. (13)}$$

### 3.13.3 Perda de revestimento

Para a determinação da perda de revestimento foram separadas cinco unidades de camarão. Primeiro foi determinado a taxa de absorção do revestimento com a pesagem e posteriormente do revestimento ( $W_3$ ) e após serem congeladas ( $W_4$ ) de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Capacidade de absorção do revestimento} = W_4 - W_5 / W_4 \times 100 \quad \text{Eq. (14)}$$

Para a determinação da perda de revestimento foram realizadas as pesagem dos exemplares de camarão revestidos ( $W_5$ ) a cada 30 dias de acordo com a fórmula:

$$\text{Perda de revestimento} = W_5 - W_4 / W_4 - W_3 \quad \text{Eq. (15)}$$

## 3.14 Análises físico-químicas

### 3.14.1 Composição centesimal

Foram realizadas análises de composição centesimal em triplicata de todos os tratamentos. A composição química centesimal corresponde à determinação quantitativa

expressa em percentagem de umidade, proteína, gordura e cinza. E a soma destes componentes deve ficar muito próxima de 100.

#### 3.14.1.1 Determinação da umidade

Seu princípio baseia-se na perda de água e substâncias voláteis. Foi determinado seguindo a técnica descrita por (NAGAKURA, 1972). Em cadinhos de porcelana previamente tarados, foram pesados aproximadamente dois a cinco g da amostra homogeneizada, e em seguida colocados em estufa a 100°C por um período de 24h.

Após esse período, os cadinhos de porcelana foram transferidos para um dessecador até atingir o equilíbrio em temperatura ambiente para posterior pesagem. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre o peso inicial e final das amostras, sendo este valor expresso em percentagem.

Cálculos:

$$U = \frac{V_1 - V_2}{V_2 - V_0} \times 100$$

Onde:

U - umidade

V<sub>0</sub> - peso do cadinho seco

V<sub>2</sub> - peso do cadinho com amostra

V<sub>1</sub> - peso do cadinho c/ amostra após secagem

#### 3.14.1.2 Determinação da matéria mineral (Cinzas)

Realizada segundo a técnica descrita nos métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de pescado e seus derivados (BRASIL, 2011). Seu princípio baseia-se na perda de água e substâncias voláteis. Os cadinhos de porcelana foram previamente tarados contendo aproximadamente dois grama de cada amostra obtida a partir do procedimento de determinação da umidade onde foram colocados em forno mufla a 550°C por um período de quatro horas. Em seguida, os cadinhos foram transferidos para um dessecador até atingir a temperatura ambiente, quando então foram pesados. O teor de cinzas foi determinado pela diferença entre os pesos inicial e final das amostras e expresso em percentagem.

$$\% \text{ de resíduo mineral fixo} = (mc + c - mc) \times 100/ma$$

ma = massa da amostra, em gramas;

mc+c = massa das cinzas + cadinho, em gramas;

mc = massa do cadinho, em gramas.

#### 3.14.1.3 Determinação da proteína bruta

O teor de proteína total foi determinado através do método micro Kjeldahl (PEARSON, 1973). Seu princípio 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, que foi fixada em solução ácida e quantificada por titulometria ácido-base.

Em papel manteiga foram pesados 0,2 g da amostra homogeneizada e em seguida, colocados em tubos digestores e acrescidos dois gramas do catalisador (mistura de sulfato de cobre, selênio metálico e sulfato de potássio) e quatro mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). As amostras foram então levadas ao aparelho digestor a temperatura de 350°C até a sua digestão completa.

No aparelho de destilação a mistura foi neutralizada com hidróxido de sódio a 50% até surgir uma coloração escura oriunda do óxido de cobre que foi formado por essa neutralização. A mistura foi destilada através do arraste com vapor e o produto da destilação foi recolhido em um erlemeyer contendo 10 mL da solução de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) a 2% e foram adicionadas aproximadamente três gotas do indicador misto (mistura de vermelho de metila e verde de bromocresol). O destilado foi titulado com ácido clorídrico a 0,04 N. Foi utilizado o fator de 6,25 para conversão do nitrogênio total em proteína bruta.

#### 3.14.1.4 Determinação do extrato etéreo (lipídios)

O teor de lipídios totais foi determinado segundo a técnica descrita nos métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de pescado e seus derivados (MAPA, 2011). O solvente a ser utilizado para extração dos lipídeos foi a acetona. Os balões de Soxhlet foram colocados na estufa a 100°C durante uma hora. Após esse período foram levados ao dessecador até atingir temperatura ambiente e em seguida foram pesados. Cinco gramas da amostra homogeneizada foram pesados nos cartuchos de extração (papel filtro). Após a

pesagem, foram colocados nos balões e levadas ao aparelho de *Soxhlet* para a extração durante três horas. Após o procedimento de extração, os balões contendo o lipídeo foram acondicionados no dessecador até atingirem temperatura ambiente e em seguida foram pesados. O percentual de lipídios foi calculado através da relação entre o peso do lipídeo extraído e o peso inicial da amostra.

### ***3.14.2 Análises físico-químicas e microbiológicas dos exemplares de camarão *Litopenaeus vannamei* congelados, descascados e sem cabeça.***

#### ***3.14.2.1 Medição do pH***

O potencial hidrogeniônico foi medido com o auxílio de um potenciômetro digital (PHTEH Modelo PHS-3B), através da obtenção do filtrado a partir da homogeneização de 10g da amostra macerada com 100 ml de água destilada por 30 segundos de acordo com a metodologia citada nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008).

#### ***3.14.2.2 Bases nitrogenadas voláteis totais (TVB-N)***

As bases voláteis totais (N-BVT) foram determinadas pelo método de destilação com modificações (MALLE; TAO, 1987). Para a preparação do extrato foram pesados em balança analítica (Ohaus) 10g, previamente triturados em um multiprocessador (Arno), dos exemplares de camarão descascados e sem cabeça de cada tratamento. Em seguida foram adicionados 90 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 7,5% (v/v). Esse homogenato permaneceu em repouso durante 30 minutos. Logo após, o homogeneizado foi filtrado em papel de filtro para obtenção de um extrato límpido.

Nos tubos de destilação foram adicionados 25 mL do extrato filtrado com cinco mL de hidróxido de sódio a 10% (p/v). Utilizou-se, ainda, ácido bórico a 4% (p/v) com 0,04 mL de indicador misto (vermelho de metila e verde de bromocresol) em cada erlenmeyer para serem então destilados.

A destilação foi realizada em destilador de Nitrogênio (TECNAL modelo TE-036/1) até a obtenção de um volume de 50 mL de solução. As quantidades de N-BVT foram calculadas a partir do volume de ácido sulfúrico 0,05 M utilizado para a titulação. Os valores foram expressos em mg de N-BVT/100 g de camarão descascados e sem cabeça e calculado através da Equação 16 a seguir:

$$N\text{-BVT} + (14 \text{ g / mol} \times a \times b \times 300) / 25 \text{ mL} \quad \text{Eq. 16}$$

Onde:

a = mL de ácido sulfúrico gasto na titulação

b = normalidade do ácido sulfúrico (0,1)

### 3.14.2.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação da oxidação lipídica das amostras foi realizada pela avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como descrito por Vyncke (1970). Para a preparação do extrato foram pesados em balança analítica (Ohaus) 10g dos exemplares de camarão descascados e sem cabeça de cada tratamento. Logo em seguida foram homogeneizados em 50 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 7,5% (v/v), permanecendo em repouso por cinco minutos.

Após o período de repouso, o homogeneizado foi filtrado em papel de filtro para obtenção de um extrato límpido. Foram então adicionados cinco mL da solução do extrato com cinco mL do ácido tiobarbitúrico a 0,02M, sendo homogeneizados com auxílio de um agitador de tubos (Vortex modelo QL-901). Para o branco utilizou-se cinco mL de ácido tiobarbitúrico e cinco mL de água destilada. Em seguida, os tubos foram acondicionados em banho maria (Banho maria microproce SSADO, modelo 0215M2, Quimis) a 90°C por 10 minutos e posteriormente resfriados em água com gelo, para o desenvolvimento de uma coloração rosa.

Para determinar o valor de TBARS em mg de malonaldeído equivalentes / kg de músculo do camarão utilizou-se a curva padrão a partir de 1,1,3,3- tetraetoxipropano (TEP). A evolução da oxidação lipídica foi acompanhada pela alteração da concentração de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico.

### 3.14.3 Análises microbiológicas

A quantificação de bactérias psicotróficas seguiu as recomendações da *American Public Health Association* (APHA), na sua quarta edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (DOWNES; ITO, 2001).

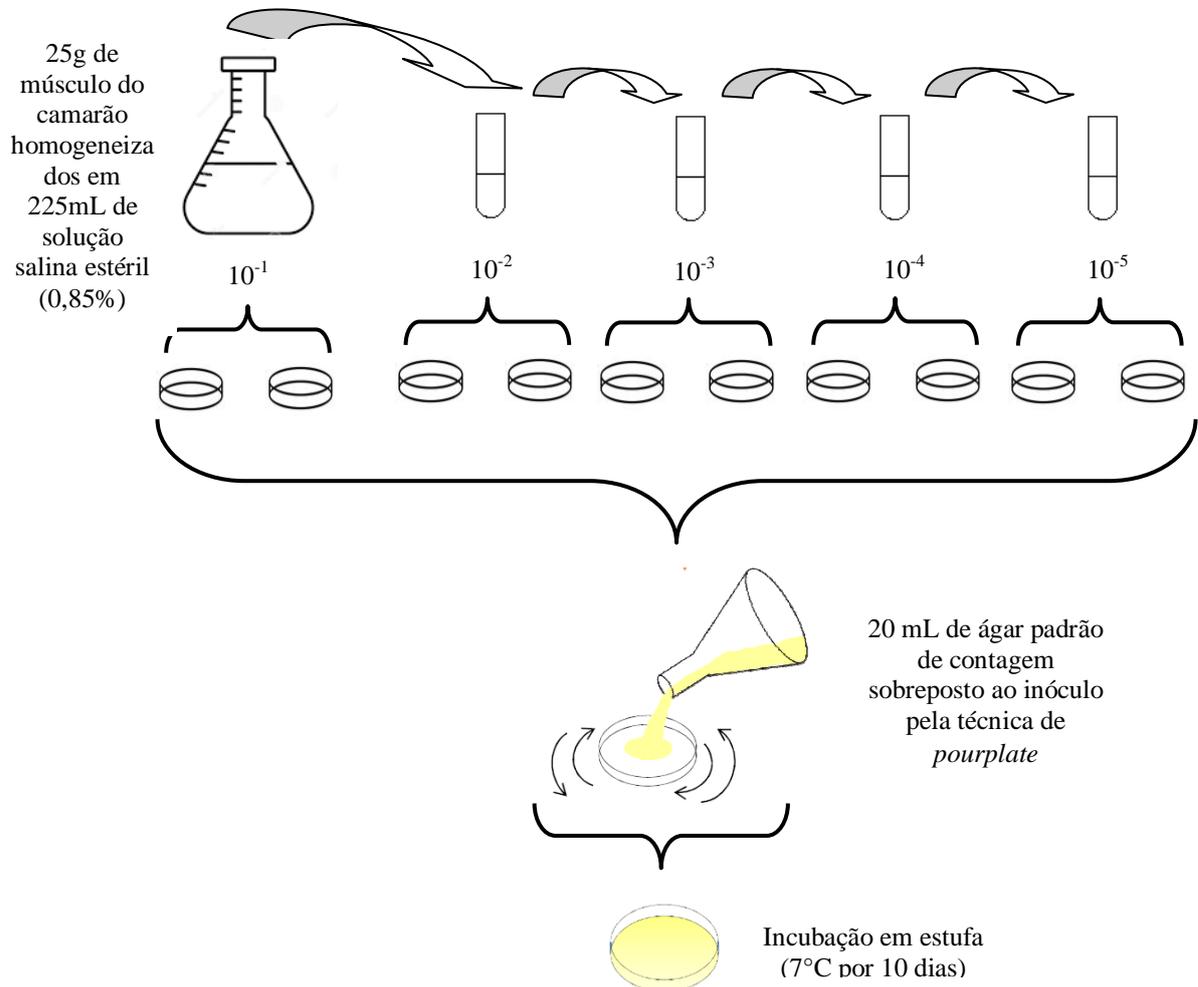
No laboratório de Microbiologia, em ambiente asséptico, foram retiradas e maceradas 25 g de músculo e homogeneizadas em 225 mL de solução salina estéril a 0,85% de NaCl, correspondendo à diluição de  $10^{-1}$  (Figura 9). Deste homogenato, foi retirada uma alíquota de um mL e diluída em nove mL de solução salina estéril a 0,85%, correspondendo à diluição  $10^{-2}$ , e assim sucessivamente até a diluição  $10^{-5}$ .

A técnica utilizada para o preparo das placas foi a de *pour plate*. Os tubos de cada diluição foram homogeneizados com auxílio de um agitador de tubos (Vortex modelo QL-901). De cada diluição foi retirada uma alíquota de um mL e inoculada em placas de Petri, em duplicata, na qual foram colocados 15 mL de Agar Padrão para Contagem (PCA) pela técnica de *pour plate* (SWANSON; PETRAN; HANLIN, 2001). As placas para contagem de bactérias psicotróficas foram invertidas e incubadas a temperatura de 7°C por 10 dias em Estufa de incubação do tipo DBO (QUIMIS modelo Q 315M26).

#### 3.14.3.1 Determinação do Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Para o cálculo da Contagem Padrão em Placas (CPP) foram selecionadas placas com crescimento entre 25 e 250 unidades formadoras de colônias (UFC). O resultado da CPP foi calculado pela expressão: UFC x inverso do fator de diluição, sendo UFC/g de músculo (DOWNES; ITO, 2001). As amostras que não apresentaram placas com crescimento no intervalo estipulado tinham suas contagens estimadas (est.).

Figura 9 – Fluxograma da Contagem Padrão em Placas (CPP) de bactérias psicotróficas nas amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado, descascado e sem cabeça durante o período de estocagem de 180 dias



FONTE: AUTOR (2019).

### 3.15 Análises estatísticas

Os resultados foram avaliados usando a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. A análise estatística foi realizada utilizando o software SigmaStat (versão 3.5).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Rendimento e composição química dos polissacarídeos sulfatados da *Gracilaria birdiae*.

A alga vermelha *Gracilaria birdiae* foi sujeita à extração de polissacarídeos sulfatados em meio aquoso e o rendimento e a composição química estão relatados na Tabela 1.

Tabela 1 – Rendimento e composição química dos PS de *Gracilaria birdiae*

Rendimento	Composição Química (%)		
	Carboidratos Totais	Sulfato	Proteínas Contaminantes
26,43%	85,1%	8,1%	0,0%

FONTE: AUTOR (2019)

\* a = rendimento expresso em termos de alga seca e moída .

Mello *et al.*, (2002) extraíndo PS de exemplares da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* apresentaram um rendimento aproximado no valor de 22,3%. A pesquisa de Alencar (2007) também apresentou um resultado semelhante 28,4%, porém a espécie pesquisada foi uma alga parda, a *Lobophora variegata*.

Valores de rendimento podem variar de acordo com a espécie e também com a metodologia aplicada (PERCIVAL; McDOWELL, 1967; VILLANUEVA; PAGBA; MONTANO, 1997). Pois a metodologia pode ser de origem enzimática, ácida e/ou aquosa (RODRIGUES *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2019).

Melo *et al.*, (2012) obtiveram a partir de frações de PS da alga parda *Dictyopteris justii* que foram precipitadas com adições de volumes crescentes de acetona, encontraram valores diferentes para o rendimento 1, 9, 21, 27 e 42%. Desse modo, a acetona separou tais frações polissacarídicas pela forma de interação destas com a água. Portanto, aqueles que interagiram mais com a água foram os últimos a precipitarem (MAGALHÃES *et al.*, 2011).

Vale ressaltar que a temperatura nas extrações aquosas também influencia nos valores de rendimento, como pode ser observado nos trabalhos de Sousa *et al.*, (2012) e Maciel *et al.* (2008), que apresentaram os seguintes percentuais, 27,2 e 6,5 %, respectivamente. Sendo que Sousa *et al.*, (2012) extraíram o PS da *G. birdiae* a 90 °C e

Maciel a 25 °C, ambos utilizaram a mesma espécie de alga do presente estudo. O percentual obtido no presente estudo foi bem próximo ao de Souza *et al.*, (2012), que foi de 26,43% utilizando a mesma temperatura destes autores.

Temperaturas mais elevadas apresentaram valores maiores de rendimento dos PS quando comparadas a pesquisa que utilizou temperatura ambiente. E o presente estudo apresentou valores similares ao de Souza *et al.*, (2012) onde ambos adotaram a mesma temperatura de extração dos PS obtidos do ágar da mesma espécie de alga marinha vermelha pesquisada.

Além dos fatores já citados anteriormente, Armis (1995) mostrou que em geral, o rendimento da extração de PS das espécies de *Gracilaria* é muito variável devido a vários fatores, tais como: condições ambientais, variação sazonal e fatores fisiológicos.

Somou-se ainda, a composição de carboidratos totais indicada na Tabela 1 que apresentou um teor de 85,1% e o conteúdo de sulfato de 8,1 % nas amostras de ágar analisadas, como em coerência com a pesquisa de Sousa *et al.*, (2012), que encontraram valores semelhantes para a mesma espécie de alga analisada, 85,6 e 8,4% respectivamente, para carboidratos totais e o conteúdo de sulfato.

Adotando os valores de sulfato da pesquisa de Sousa *et al.*, (2012), que foram bem próximos ao do presente estudo e comparando ambos com os de Mazumder *et al.* (2002), que encontraram níveis de sulfato variando de 2,1 a 11,7% para frações de *Gracilaria corticata*, pode-se observar que os níveis mais altos foram atribuídos às frações obtidas pelo método de extração do PS à temperaturas mais baixas. Fato esse que demonstra que as baixas temperaturas influenciam na obtenção de menores valores de rendimento, porém permitem a detecção de maiores concentrações de sulfato. As frações de ágar mais solúveis, são aquelas mais ricas em sulfato e, portanto, de maior caráter iônico (polaridade).

Não foi detectada a presença de proteínas (Tabela 1) no presente estudo e o mesmo ocorreu no trabalho de Souza *et al.* (2012).

## **4.2 Análises térmicas do polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria birdiae***

### **4.2.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**

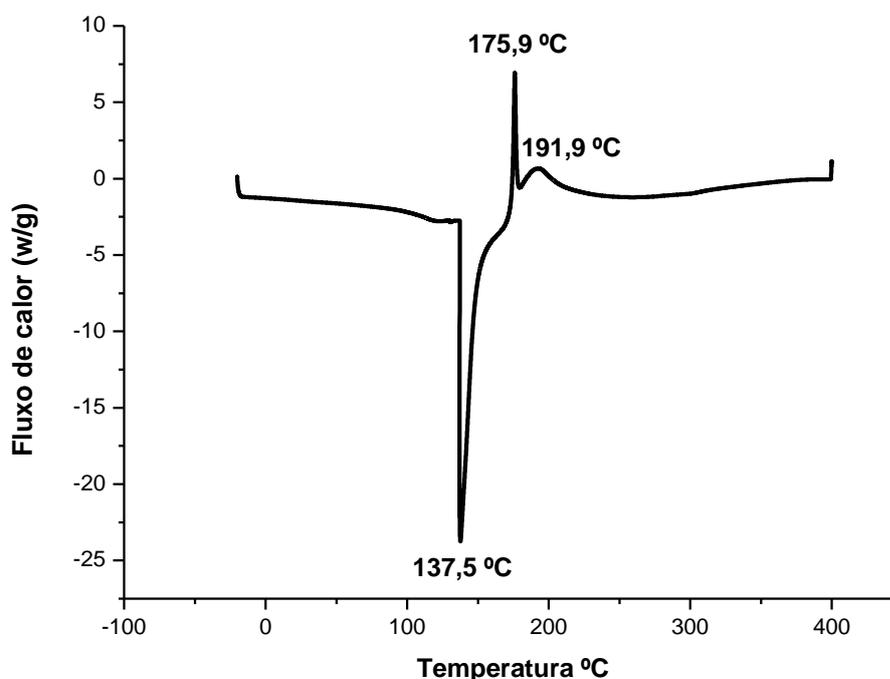
A análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) do PS extraído da alga vermelha marinha *Gracilaria birdiae* foi realizada com o objetivo de verificar as transições físicas e/ou químicas ocorridas durante a exposição do polímero à diferentes temperaturas. A

DSC é uma ferramenta poderosa para analisar o comportamento térmico de vários biopolímeros (MARTINS *et al.*, 2018). O conhecimento de suas propriedades termofísicas é importante para determinar as mudanças físicas e químicas para qual os PS's possam ser submetidos.

De acordo com Canevarolo (2004), os eventos térmicos que geram modificações em curvas de DSC podem ser basicamente transições de primeira e de segunda ordem. As transições de primeira ordem apresentam variações de entalpia – endotérmica ou exotérmica – e dão origem à formação de picos. Fusão, perda de massa da amostra (vaporização de água, aditivos ou produtos voláteis de reação ou de decomposição), dessorção e reações de redução são citados como exemplos de eventos endotérmicos que podem ocorrer em amostras de vários materiais. Eventos exotérmicos podem ser: cristalização, reações de polimerização, cura, oxidação, degradação oxidativa, adsorção, entre outros. As transições de segunda ordem caracterizam-se pela variação da capacidade calorífica, porém sem variações de entalpia.

A Figura 10 descreve o comportamento térmico da curva de DSC para o PS extraído da alga vermelha *Gracilaria birdiae* no intervalo de temperatura de 25°C a 400°C (↑).

Figura 10 – Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) do PS da *Gracilaria birdiae*



FONTE: AUTOR (2019)

Como pode ser visualizado nesta curva, o primeiro evento térmico (ponto 1) apresentou uma transição endotérmica, com temperatura 137,5 °C e entalpia de 291,3 J/g. Provavelmente nesse primeiro evento térmico pode ter ocorrido a fusão do PS. Pois o aquecimento acima da temperatura de cristalização resulta no surgimento de um pico endotérmico na curva de fluxo de calor, correspondendo à temperatura de fusão, que está relacionada a um aumento significativo do movimento das cadeias moleculares devido à desestruturação dos cristais pelo aumento da temperatura (DAVANÇO, 2006).

Rocha *et al.*, (2019) caracterizando PS obtidos pelo método de extração à quente, da alga vermelha *Gracilaria tikvahiae*, detectaram três picos endotérmicos no primeiro ciclo de aquecimento: um ligeiramente abaixo de 100 °C, outro em torno de 130 °C e o maior próximo a 140 °C. No caso desse estudo, o primeiro pico é geralmente atribuído à água residual presente na amostra que pode estar ligada ou adsorvida (OUYANG *et al.*, 2018). Os picos que ocorreram na faixa de 126 a 144°C (onde se enquadra a temperatura do pico do primeiro evento térmico do presente estudo) correspondem ao ágar em transição para um estado desordenado, ou seja, a amostra não retomará seu estado helicoidal duplo, o que ocasionará a fusão do polímero (ROCHA *et al.*, 2019). Shukla *et al.* (2012) caracterizando filmes a base de PS extraído da alga vermelha *Gracilaria dura*, com a adição de nanopartículas de prata para fins antibacterianos, encontraram para o PS dois picos na curva de DSC. O pico endotérmico foi a 71,6 °C e o pico exotérmico ocorreu a 256,5 °C. Tais valores não são próximos ao do presente estudo, o que demonstra variedade na composição química das algas. Embora as espécies pesquisadas, tanto a do presente trabalho como a da pesquisa de Shukla *et al.* (2012) pertençam ao mesmo gênero, a composição química de ambas as espécies pode ser diferente, pois seus componentes dependem das condições ambientais, variação sazonal, fatores fisiológicos, dentre outros. Rocha *et al.* (2019) verificaram tal fato quando caracterizam os PS da alga vermelha *Gracilaria tikvahiae* coletada em duas localidades diferentes.

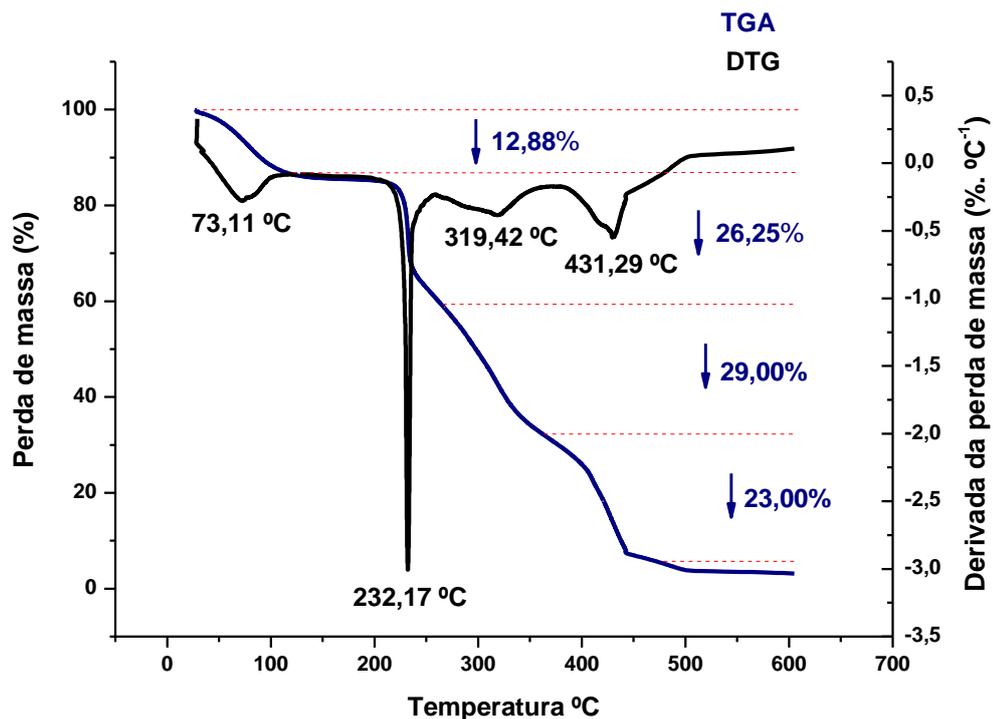
No segundo evento térmico (ponto 2), a curva apresentou uma transição exotérmica a 175,90°C e tal pico indica a degradação do polímero. O terceiro pico exotérmico (191,90°C) pode estar relacionado a uma contaminação da amostra como ocorreu no trabalho de Archana *et al.* (2013), que verificaram impurezas durante a realização das análises de decomposição térmica de suas amostras.

### 4.2.3 Termogravimetria (TGA)

Devido ao fato de que os PS são utilizados em diversas áreas, tais como: alimentícia, farmacêutica, biotecnológica, dentre outras, torna-se de suma importância o conhecimento de suas propriedades térmicas de decomposição. Pois tal conhecimento pode indicar as possíveis aplicações destes biopolímeros em uma escala industrial. A análise termogravimétrica (TGA) e a sua derivada (DTG) permitem quantificar a perda de massa envolvida durante o aquecimento de um determinado material, o que vai revelar o comportamento de degradação térmica do mesmo (VALE, 2017).

O termograma e sua derivada do PS extraído da alga marinha vermelha *G. birdiae* estão representados na Figura 11.

Figura 11 – Análise Termogravimétrica do PS da *Gracilaria birdiae*



FONTE: AUTOR (2019).

A primeira decomposição ocorrida a 73,11 °C está relacionada à perda de água e corresponde a 12,88% da massa total do PS. A decomposição do polímero ocorre em três temperaturas diferentes: primeira a 232,17 °C (com perda de massa de 26,25%); segunda a 319,42 °C (com perda de massa de 29,0%) e a terceira ocorreu a 431,29 °C (com perda de

massa de 23,0%). Em adição, a decomposição do PS não se completou em 600 °C, restando ainda um resíduo de 8,87%, correspondente às cinzas. Archana *et al.* (2013) caracterizando o ágar extraído da alga vermelha *Gracilaria corticata* apresentaram um TGA semelhante ao do presente estudo, com quatro temperaturas de decomposição para o PS em questão. Estes autores relataram que a 289 °C ocorreu a perda de componentes orgânicos e a 817 °C ocorreu a perda de substâncias inorgânicas que podem estar relacionadas com a ocorrência de metilação que libera materiais inorgânicos tais como óxidos, resíduos de carbonáceos, dentre outros.

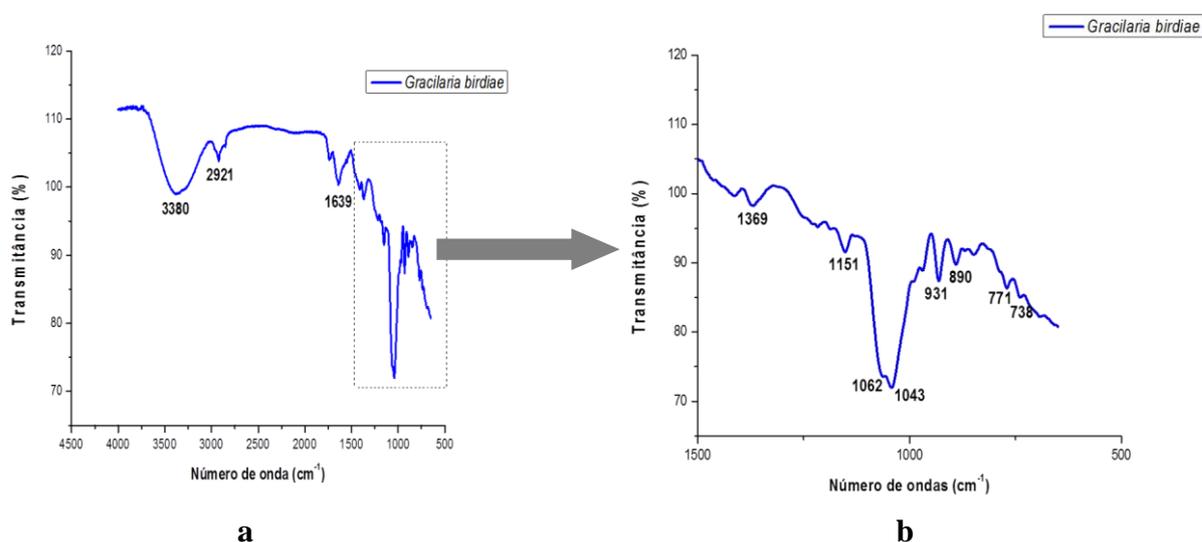
A TGA do PS do presente estudo sugere que ele é termoestável e pode ser usado na formação de biomateriais para vários fins industriais, como por exemplo: aumentar a estabilidade em bolos e de alimentos congelados durante o processo de congelamento, controlando o crescimento de cristais; estabilizando suspensões ou emulsões em tintas e também podem ser utilizados em encapsulamentos de drogas e alimentos (ARCHANA *et al.* 2013).

### **4.3 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)**

A FTIR pode ser usada para identificação e caracterização de compostos orgânicos e inorgânicos. É considerada uma das mais importantes técnicas experimentais para a caracterização de polímeros, em termos de identificação e/ou determinação de características estruturais dos polímeros, principalmente no que se refere a grupos funcionais presentes na amostra. Além das informações qualitativas, a análise por FTIR permite a determinação semi-quantitativa de componentes de uma amostra ou mistura, esteja ela no estado sólido, líquido, gasoso ou em solução (não-aquosa). Dependendo da natureza da amostra a ser analisada pode ser uma técnica fácil e rápida, sendo possível também analisar amostras pequenas ou em pequenas quantidades (SMITH, 1979).

A Figura 12 demonstra a espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) utilizada para identificar a presença dos grupos funcionais característicos da extração dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae*.

Figura 12 – a) Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para o PS extraído da *Gracilaria birdiae* na faixa de 4500 a 500  $\text{cm}^{-1}$ . b) Ampliação da FTIR para o PS extraído da *Gracilaria birdiae* na faixa de 1500 a 500  $\text{cm}^{-1}$



A Figura 12 apresenta bandas situadas em basicamente 11 regiões do espectro. A banda localizada em  $3380 \text{ cm}^{-1}$  é atribuída à deformação axial do grupamento hidroxila (OH) de PS. Segundo Wang; Bi (2008), polissacarídeos contêm um número significativo de grupos hidroxila, exibindo uma ampla banda em  $3000 \text{ cm}^{-1}$ . Tal fato também está de acordo com a pesquisa de Onofre (2014) na caracterização de PS para fins biomédicos. O pico característico em  $1639 \text{ cm}^{-1}$  é atribuído ao estiramento de  $\text{C} = \text{O}$  (SELVALAKSHMI *et al.*, 2017). As bandas  $1369$ ,  $1155$  e  $1043 \text{ cm}^{-1}$  são características das agaranas e estão em concordância com os dados obtidos no trabalho de Cian *et al.*, (2014) que caracterizaram PS da alga vermelha *Porphyra columbina* e no de Zhang *et al.* (2005) com a caracterização de PS de *Porphyra capensis*. Essas bandas são as mais relevantes, pois estão relacionadas ao modo de vibração dos grupamentos éster sulfatos ( $\text{S} = \text{O}$ ) e especificamente vibrações ocorridas em torno da banda  $1043 \text{ cm}^{-1}$  referem-se ao esqueleto das galactanas (MOLLET; RAHAOUI; LEMOINE, 1998; PRADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2003). A região em torno de  $931 \text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao grupo  $\text{C} - \text{O} - \text{C}$  grupo de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose e a banda  $890 \text{ cm}^{-1}$  é característica de ágar (SOUZA *et al.*, 2012). E por último, as bandas  $771$  e  $738 \text{ cm}^{-1}$  estão relacionadas com a flexão esquelética do anel de galactose (RHEIN-KNUDSEN *et al.*, 2017).

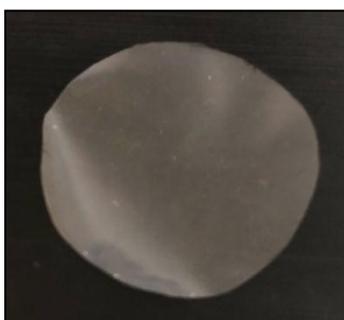
A região detectada no espectro de infravermelho do presente estudo apresentou uma boa representatividade de bandas características de agarocolóides e está de acordo com os resultados obtidos por outros autores (MELO *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2005; MACIEL

*et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2012; CIAN *et al.*, 2014; RHEIN-KNUDSEN *et al.*, 2017; SELVALAKSHMI *et al.*, 2017).

#### **4.4 Caracterização dos filmes comestíveis obtidos do polissacarídeo sulfatado extraído da *Gracillaria birdiae***

##### **4.4.1 Obtenção e descrição do filme.**

Figura 13 – Filme elaborado com PS de *Gracillaria birdiae*



Fonte: FONTE: AUTOR (2019)

Os filmes elaborados com o PS extraído da alga marinha vermelha *Gracillaria birdiae* mostraram-se homogêneos, flexíveis, facilmente manipuláveis e com bom aspecto visual (Figura 13).

Filmes comestíveis a base de PS geralmente possuem boas propriedades protetoras contra umidade, semelhante a outros filmes comestíveis a base de hidrocolóides e além disso, apresentam boas propriedades mecânicas. Tendem a serem transparentes, homogêneos e de fácil manuseio (PHAN *et al.*, 2005).

##### **4.4.2 Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade**

Na tabela 3 estão descritos os valores da permeabilidade ao vapor de água (PVA), solubilidade e espessura para as diferentes combinações de PS e glicerol na elaboração dos filmes comestíveis.

Tabela 2 – Valores de permeabilidade ao vapor da água (PVA), solubilidade e espessura (média  $\pm$  desvio padrão) dos filmes de polissacarídeo sulfatado (1,0; 1,5 e 2,0%) obtido da alga vermelha *Gracilaria birdiae* com diferentes concentrações de glicerol (0,0; 0,1 e 0,2%).

Concentrações (%)	Permeabilidade ao vapor de água - PVA (g/m.dia.atm)	Solubilidade (%)	Espessura (mm)
<b>1,0 PS + 0,0 G</b>	1,69 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	88,03 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	0,87 $\pm$ 0,01
<b>1,0 PS + 0,1 G</b>	1,71 $\pm$ 0,07 <sup>abc</sup>	85,87 $\pm$ 0,44 <sup>ab</sup>	0,91 $\pm$ 0,01
<b>1,0 PS + 0,2 G</b>	1,76 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>	82,78 $\pm$ 0,23 <sup>c</sup>	0,10 $\pm$ 0,10
<b>1,5 PS + 0,0 G</b>	1,72 $\pm$ 0,11 <sup>ab</sup>	87,95 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>	0,88 $\pm$ 0,01
<b>1,5 PS + 0,1 G</b>	1,97 $\pm$ 0,11 <sup>cd</sup>	84,41 $\pm$ 0,38 <sup>b</sup>	0,90 $\pm$ 0,09
<b>1,5 PS + 0,2 G</b>	1,91 $\pm$ 0,09 <sup>bc</sup>	82,13 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>	0,10 $\pm$ 0,01
<b>2,0 PS + 0,0 G</b>	1,92 $\pm$ 0,05 <sup>bc</sup>	86,75 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	0,89 $\pm$ 0,10
<b>2,0 PS + 0,1 G</b>	2,01 $\pm$ 0,04 <sup>d</sup>	84,77 $\pm$ 0,46 <sup>ab</sup>	0,93 $\pm$ 0,01
<b>2,0 PS + 0,2 G</b>	1,76 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>	82,78 $\pm$ 0,23 <sup>c</sup>	0,10 $\pm$ 0,10

PS = Polissacarídeo Sulfatado; G = Glicerol. As médias mais o desvio padrão com letras distintas possuem diferença estatisticamente significativa entre si pelo teste de Tukey (ANOVA  $p < 0,05$ ).

Os valores de espessura que se encontram na Tabela 3 variaram de 0,10  $\pm$  0,01 a 0,93  $\pm$  0,01 mm. A variação da espessura apresentou o mesmo comportamento para as três concentrações de PS. Quando foram adicionados nos filmes 0,1% de glicerol os valores das espessuras destes também aumentaram. Porém, ao aumentar a concentração do plastificante glicerol para 0,2% ocorreu um decréscimo significativo no valor das espessuras.

A eficiência funcional dos filmes depende da composição, do processo de formação e de sua aplicação, sendo influenciadas por fatores como espessura, umidade, entre outros (SOBRAL, 2000). A espessura de um filme pode ser relacionada com a PVA do mesmo, pois esses parâmetros tendem a apresentar uma relação indireta, já que geralmente, em filmes mais espessos os valores de PVA tendem a serem menores e vários autores já relataram que a espessura influencia na taxa de transferência de vapores e solutos (GENNADIOS; WELLER; GOODING, 1994; MCHUGH; KROCHTA, 1994)

A Lei de Fick diz que a permeabilidade, sob um determinado gradiente de pressão de vapor, pode variar inversamente com a espessura do filme. Porém, muitos autores já observaram que a PVA não é significativamente afetada quando a espessura é maior que 0,03

– 0,06 mm (GREENER-DONHOWE; FENNEMA, 1994; CUQ *et al.*, 1996; DEBEAUFORT; VOILLEY; GUILBERT, 2002).

Os valores encontrados para PVA dos filmes à base de PS do presente estudo variaram de  $1,69 \pm 0,12$  a  $2,01 \pm 0,04$  g/m.dia.atm (Tabela 3). A concentração de 0,1% de glicerol aumentou o valor de PVA. Entretanto, o mesmo não ocorreu quando a concentração de glicerol foi de 0,2%. Tal fato contradiz o que Pinheiro *et al.*, (2010) relataram, que em filmes de polissacarídeos, a adição de plastificantes pode levar ao aumento dos valores de PVA devido à maior afinidade do sistema em atrair moléculas de água, pois os plastificantes apresentam comportamento hidrofílico. O que pode ter ocorrido no presente trabalho é que em maiores concentrações de plastificante pode haver uma maior interação entre o mesmo e o polímero, provavelmente devido a ligações de hidrogênio. Tal fato foi similar ao de Veiga-Santos *et al.* (2005) quando pesquisaram diferentes concentrações de plastificantes em filmes a base de amido de milho.

O comportamento da concentração do polímero foi similar ao do plastificante. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) com o aumento de concentração de 1,0 para 1,5%. Porém quando essa concentração de 1,5 passou para 2,0%, não ocorreu diferença estatística significativa. O aumento na PVA com a adição de 0,5% do polímero pode ter ocorrido devido a uma maior disponibilidade da porção hidrofílica do filme e quando a concentração foi aumentada para 2,0% pode ter ocorrido um rearranjo na rede polimérica dos filmes, o que tende a minimizar a transferência de vapores de água.

Já Cerqueira *et al.* (2009) produziram filmes a base de PS das algas *G. triacanthos* e *G. birdiae* com diferentes concentrações de sorbitol e glicerol e óleo de milho. Tais autores identificaram que com o aumento da concentração do polímero houve uma diminuição nos valores de PVA. Estes autores sugeriram que a PVA diminuiu devido à adição do óleo de milho, o que ocasionou uma diminuição no comportamento hidrofílico dos filmes.

Phan *et al.*, (2005) pesquisando as propriedades físicas de filmes a base de PS a 3% com adição de glicerol a 0,1% obtiveram valores de PVA superiores ao do presente estudo, variando de 7.21 a 13.70 ( $10^{-11}$  g m<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup>) e com a umidade relativa variando de 22 a 57%. Devido a uma boa hidrofiliabilidade que é inerente aos polissacarídeos e a utilização de plastificantes na formulação dos filmes, tanto os dados de PVA destes autores quanto os do presente estudo são considerados baixos quando comparados a filmes sintéticos, tais como os filmes de polietileno de baixa densidade e de celofane (PHAN *et al.*, 2005). Porém os filmes elaborados no presente estudo possuem valores de PVA semelhantes a filmes feitos a base de

glúten (GENNADIOS; WELLER; TESTIN, 1993) e também os que são oriundos de proteína do soro do leite (MARÍA; PÉREZ-GAGO; KROCHTA, 2002).

É importante ressaltar que a umidade também possui grande influência na taxa de permeabilidade de água e solutos dos filmes a base de PS. Os do presente estudo foram elaborados em umidade controlada a 10%, porém tais filmes podem aumentar ainda mais os valores de PVA em ambientes com alta taxa de umidade devido à adsorção de moléculas de água na superfície externa destes filmes. Segundo Phan *et al.*, (2005) pode ocorrer um rearranjo polimérico devido o comportamento hirofilico do PS e também do glicerol, o que facilita a passagem de moléculas de água por difusão através dos filmes.

Uma elevada concentração de plastificante utilizado na elaboração dos filmes também pode afetar diretamente as propriedades de transporte destes, tais como a taxa de PVA. Pois a capacidade de como o plastificante vai atuar na redução das forças intermoleculares e na mobilidade da cadeia é dependente da configuração do polímero, do número de hidroxilas livres e da compatibilidade do plastificante com o polímero (SANTA CRUZ *et al.*, 2015). Souza *et al.*, (2009) reforçam ainda que durante a elaboração de um filme comestível, além da interferência desses fatores, a umidade relativa a qual o filme será exposto também possui grande influência na estabilidade do mesmo.

Sousa *et al.*, (2010) na elaboração de filmes a base de ágar comercial e de PS extraído da alga vermelha *Gracilaria vermiculophylla* (ambos os polímeros a 1% e com adição de glicerol a 0,1% em cada formulação) apresentaram valores mais próximos de PVA com os do presente estudo, onde tais valores foram, respectivamente, 3.32 e 3.44 ( $10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ ). Os autores relataram que apesar da adição de plastificante, ambos os filmes exibiram menor PVA do que outros biopolímeros de polissacarídeos estudados anteriormente (SOUSA *et al.*, 2008).

Já Giménez *et al.*, (2013) elaborando filmes a base de PS a 1,5% com adição de 0,1 % de glicerol obteve um resultado acima do presente estudo 7.35 ( $\text{g mm/h Pa cm}^2$ ). Os autores relataram ainda que valores de PVA próximos aos destes filmes são geralmente os mesmos valores encontrados em filmes oriundos de outros polímeros tais como amido de milho, hidroxipropilmetilcelulose e gelatinas de peixe (GENNADIOS; WELLER; GOODING, 1994; SOBRAL; HABITANTE, 2001; GARCÍA; MARTINO; ZARTIZKY, 2008).

Em contraste, Hong; Lin; Song (2009) afirmam que a PVA de filmes comestíveis pode diminuir com a inclusão de determinados compostos que venham a agregar valor aos filmes, tais como compostos antioxidantes e antimicrobianos. Tais autores, ao produzirem

filmes comestíveis a base de PS da alga vermelha *Gelidium corneum* com a adição de concentrações crescentes de extrato de chá verde e catequinas, detectaram uma diminuição na PVA, pois o gel produzido se mostrou mais compacto, o que pode ter gerado uma rede polimérica menos permeável.

Os valores de solubilidade do presente estudo variaram de 82,13 a 87,95% (Tabela 3). Pode-se verificar que houve uma diminuição na solubilidade dos filmes com o aumento na concentração de glicerol. Tal fato contradiz o que Nugroho; Basito (2013) descreveram no seu trabalho, que a adição de um componente hidrofílico em filmes comestíveis levará a um aumento na solubilidade. Rocha *et al.* (2014) elaborando filmes a base de amido de mandioca e de proteínas de soja observaram o mesmo comportamento dos valores de solubilidade do presente estudo. Estes autores relataram que houve uma redução na solubilidade em concentrações maiores de glicerol e isto pode ter ocorrido devido à interação aumentada entre o plastificante e proteína e/ou carboidrato, deixando menos sítios para interagirem com a água.

A determinação da solubilidade serve para verificar a capacidade de um filme comestível se dissolver em água e também serve para averiguar se o mesmo reterá água, quando usado como embalagem para alimentos. Quando um filme comestível é destinado a revestir alimentos que possuam alta atividade de água, uma baixa solubilidade pode ser considerada como um dos requisitos mais importantes (ATEF; REZAEI; BEHROOZ, 2015). No entanto, em alguns casos, uma solubilidade moderada pode ser considerada vantajosa, como por exemplo, ao se cozinhar alimentos revestidos (LAOHAKUNJIT; NOOMHORN, 2004).

Cian *et al.* (2014) desenvolvendo filmes de blendas de ficocolóides (carragena + ágar e ficobiliproteínas) sem adição de plastificante, extraídos da alga vermelha *Porphyra columbina*, encontraram valores semelhantes ao do presente estudo para a solubilidade: 80,68 a 97,85%. E a aproximação dos valores de solubilidade foi ainda mais perceptível com os filmes que possuíam uma maior quantidade da mistura de carragena + ágar (80,68 a 81,70%). Entretanto, os filmes que continham o sobrenadante (enriquecidos com ficobiliproteínas) oriundo do processo de extração do ágar e da carragenana, e que normalmente é descartado, apresentaram maiores valores de solubilidade (97,65 e 97,85%). Isso pode ser explicado tanto para os filmes do presente estudo, quanto para os dos autores já citados anteriormente, devido ao fato de que geralmente filmes com maiores concentrações de polissacarídeos tendem a apresentar um maior grau de compactação de suas matrizes. E no caso no estudo de Cian *et al.* (2014), os filmes enriquecidos com ficobiliproteínas possuem uma quantidade maior de

compostos solúveis em água, o que contribui para que estes filmes se solubilizassem bem em água.

#### 4.4.3 Cor e opacidade

A cor e opacidade dos filmes são de extrema importância para as embalagens, pois essas propriedades podem propiciar uma boa atividade óptica no controle da incidência de luz, mas ao mesmo tempo tem que assegurar uma transparência ao produto para que o consumidor possa visualizar o alimento (COSTA *et al.*, 2015).

Os valores de Luminosidade ( $L^*$ ),  $a^*$  e  $b^*$  e opacidade para cada uma das formulações de filmes produzidos, com diferentes combinações de PS e glicerol, estão representados na Tabela 4.

Tabela 3 - Valores de Luminosidade,  $a^*$ ,  $b^*$  e Opacidade (média  $\pm$  desvio padrão) dos filmes de polissacarídeo sulfatado (1,0; 1,5; e 2,0%) obtido da alga vermelha *Gracilaria birdiae* com diferentes concentrações de glicerol (0,0; 0,1 e 0,2%).

Concentrações (%)	$L^*$	$a^*$	$b^*$	Opacidade (%)
1,0 PS + 0,0 G	81,14 $\pm$ 1,22 <sup>a</sup>	-1,91 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup>	3,90 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	2,95 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>
1,0 PS + 0,1 G	84,58 $\pm$ 0,45 <sup>bc</sup>	-1,85 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	3,75 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	3,28 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>
1,0 PS + 0,2 G	85,22 $\pm$ 0,37 <sup>bd</sup>	-1,01 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	3,15 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	4,18 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
1,5 PS + 0,0 G	82,20 $\pm$ 1,31 <sup>a</sup>	-1,95 $\pm$ 0,87 <sup>a</sup>	3,14 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	2,88 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>
1,5 PS + 0,1 G	84,88 $\pm$ 1,89 <sup>bc</sup>	-1,01 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>	3,85 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	3,60 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>
1,5 PS + 0,2 G	85,35 $\pm$ 1,89 <sup>d</sup>	-1,98 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>	3,65 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	4,32 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>
2,0 PS + 0,0 G	83,27 $\pm$ 0,30 <sup>ab</sup>	-1,12 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	3,89 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	3,08 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup>
2,0 PS + 0,1 G	85,02 $\pm$ 0,87 <sup>cd</sup>	-1,72 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	3,45 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>	3,62 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>
2,0 PS + 0,2 G	85,58 $\pm$ 0,87 <sup>d</sup>	-1,03 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	3,12 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	4,39 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>

FONTE: AUTOR (2019)

PS = Polissacarídeo Sulfatado; G= Glicerol; \*L = luminosidade;  $a^*$  = coordenada vermelho/verde (-);  $b^*$  = coordenada amarelo/azul (-).

As médias mais o desvio padrão com letras distintas possuem diferenças estatisticamente significativas entre si pelo teste de Tukey (ANOVA  $p < 0,05$ ).

As concentrações diferentes dos filmes a base de PS com as combinações de glicerol apresentaram uma variação de 81,14  $\pm$  1,22 a 85,58  $\pm$  0,87 para a luminosidade. Não houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) com o aumento da concentração do polímero.

Entretanto, com a adição de 0,1% de plastificante, em todas as concentrações do polímero, pode-se verificar a ocorrência de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Os valores de  $a^*$  (eixo verde – vermelho) na escala Cielab, para o presente trabalho variaram de  $-1,01 \pm 0,14$  a  $-1,98 \pm 0,52$  e não houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para todos os filmes formulados. Os valores negativos encontrados para o parâmetro  $a^*$  indicam uma leve predominância para a cor verde. Os valores de  $b^*$  (eixo azul – amarelo) apresentaram a seguinte variação  $3,12 \pm 0,16$  a  $3,90 \pm 0,14$ . O mesmo comportamento aconteceu também para este parâmetro com relação à análise estatística, não apresentando diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) e tais valores indicam a predominância de uma coloração amarela. Tal fato foi confirmado visualmente no aumento da concentração do polímero na formulação dos filmes.

Cian *et al.*, (2014) elaborando filmes a base de ágar e carragenana encontraram valores próximos aos do presente estudo para os parâmetros  $L^*$  e  $a^*$  que foram, respectivamente  $67.1 \pm 0.2$  e  $-4.9 \pm 0.0$ . Uma maior tendência para a coloração verde também foi detectada no referido trabalho. O conhecimento da cor dos filmes é de extrema importância, pois a mesma pode afetar sua aceitação tanto em aplicações comestíveis como não comestíveis (embalagens secundárias) (ROCHA *et al.*, 2014). E dependendo de qual seja a finalidade de aplicação, filmes comestíveis com colorações não tão intensas são mais destinados a embalar produtos alimentares, que devem ser facilmente visualizados através de suas embalagens. Embalagens que dificultam a visualização dos consumidores podem afetar potencialmente a aceitação dos mesmos para determinados alimentos. Em contrapartida, filmes que possuam uma coloração mais intensa são destinados a envolver alimentos que possam sofrer alterações, como por exemplo, a degradação pela luz (SALGADO *et al.*, 2015).

A opacidade dos filmes do presente estudo variou de  $2,88 \pm 0,23$  a  $4,39 \pm 0,08$ . Tais valores praticamente não diferiram entre si ( $p < 0,05$ ), sendo observado maior valor de opacidade para o filme com 1,5% de PS e 0,2% de glicerol. Cerqueira *et al.* (2009) na elaboração de filmes a base de PS extraídos das algas vermelhas *G. triacanthos* e *G. birdiae* com diferentes concentrações de sorbitol e glicerol, encontraram maiores valores para a opacidade  $5.27 \pm 0.15$  e  $13.03 \pm 0.29$  e verificaram que quando a concentração de sorbitol aumentava, maiores eram os valores de opacidade. Souza *et al.* (2010) reportaram que quanto maior a opacidade dos filmes, menor a quantidade de luz que atravessa o mesmo, funcionando como uma barreira para controlar a incidência de luz para os produtos alimentares.

#### 4.4.4 Propriedades mecânicas

As propriedades de tração são úteis para a identificação e caracterização de filmes flexíveis e expressam a resistência do material ao alongamento e ao rompimento, quando submetidos a uma tração (OLIVEIRA *et al.*, 1996).

Os valores de tensão na ruptura e da deformação na ruptura para cada uma das formulações de filmes produzidas, com diferentes combinações de PS e glicerol, estão representados na Tabela 5.

Tabela 4 – Valores da média ( $\pm$  desvio padrão) das propriedades mecânicas dos filmes de polissacarídeo sulfatado (1,0; 1,5; e 2,0%) obtidos da alga vermelha *Gracilaria birdiae* com diferentes concentrações de glicerol (0,0; 0,1 e 0,2%).

Concentrações (%)	Tensão na Ruptura – TR (MPa)	Deformação na Ruptura – DR (%)
1,0 PS + 0,0 G	50,01 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	2,78 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>
1,0 PS + 0,1 G	49,70 $\pm$ 0,33 <sup>ab</sup>	3,01 $\pm$ 0,20 <sup>ac</sup>
1,0 PS + 0,2 G	51,03 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	2,79 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>
1,5 PS + 0,0 G	49,02 $\pm$ 0,11 <sup>ab</sup>	3,12 $\pm$ 0,41 <sup>ac</sup>
1,5 PS + 0,1 G	47,98 $\pm$ 0,37 <sup>bc</sup>	3,25 $\pm$ 0,12 <sup>bc</sup>
1,5 PS + 0,2 G	50,97 $\pm$ 0,17 <sup>ab</sup>	3,32 $\pm$ 0,12 <sup>bc</sup>
2,0 PS + 0,0 G	48,82 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>	3,88 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>
2,0 PS + 0,1 G	47,55 $\pm$ 0,29 <sup>c</sup>	3,72 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>
2,0 PS + 0,2 G	50,12 $\pm$ 0,13 <sup>ab</sup>	3,91 $\pm$ 0,19 <sup>bd</sup>

FONTE: AUTOR (2019). Descrever a sigla tr

PS = Polissacarídeo Sulfatado; G = Glicerol; TR = Tensão na Ruptura; DR = Deformação na ruptura. As médias mais o desvio padrão com letras distintas possuem diferença estatisticamente significativa entre si pelo teste de Tukey (ANOVA  $p < 0,05$ ).

Os valores de tensão na ruptura variaram de 47,55  $\pm$  0,20 a 51,03  $\pm$  0,22. Praticamente não houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Somente para o filme de 2,0% de PS com 0,1 % de plastificante.

Os filmes apresentaram uma boa resistência a tração quando comparados a outros filmes a base de proteínas (KROCHTA, 2002; MCHUGH; KROCHTA, 1994) e diferentemente dos valores de PVA, tais filmes apresentaram valores superiores de TR quando comparados a filmes de glúten (GENNADIOS; WELLER; TESTIN, 1993) e ainda maiores aos filmes comerciais de polietileno de baixa densidade e de hidroxypropilmetilcelulose (HPMC) e tão alto quanto aos de celofane (PHAN *et al.*, 2005).

Segundo Guilbert *et al.* (2002) filmes feitos de materiais fibrosos como o ágar apresentam valores superiores de TR quando comparados a filmes feitos de materiais

granulares como o amido. As propriedades mecânicas dos componentes de um filme são em grande parte associadas à distribuição e densidade dos materiais e também é influenciada pelas interações intermoleculares e intramoleculares favorecidas pelas estruturas primárias e pela configuração espacial das moléculas. E estes autores acrescentam ainda que para filmes a base de ágar, uma rede tridimensional é formada pela associação de pequenos domínios nos quais são observadas ligações de dupla hélice das cadeias poliméricas, o que favorece uma maior ocorrência de reações intramoleculares.

Para os filmes elaborados do presente estudo foi possível verificar que nas concentrações de 1,0 e 2,0% de PS não ocorreram diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) nos valores de TR. Já na concentração de 1,5% essa diferença foi detectada. Tal ocorrência contradiz o que Gimenez *et al.*, (2013) relatam, que normalmente quanto maior é a concentração do polímero na formulação de um filme maior será a resistência do mesmo. 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).

Ku, Hong; Song (2008) elaborando filmes comestíveis a base de PS a 1,5%, extraído da alga vermelha *Gelidium corneum*, obtiveram baixos valores em suas propriedades mecânicas, sendo estes 2,32 MPa para a TR e 28,96% para a DR. Eles justificam tais resultados por terem usado um polímero não tão bem purificado.

Os dados de Phan *et al.* (2005) para as propriedades mecânicas estão bem próximos ao do presente trabalho. Eles relataram valores de TR e DR de 42,11 MPa e 3,27%, respectivamente, para filmes à base de PS a 3% e com glicerol a 15%. Já os valores de TR e DR obtidos por Rhim *et al.* (2011) em filmes com PS a 2,66% e glicerol a 50% foram 29,7 MPa e 45,3%, sendo somente o valor de TR que mais se aproximou ao do presente estudo.

Giménez *et al.*, (2013) elaborando filmes a base de PS a 3,0% e com adição de glicerol a 0,1% apresentaram os seguintes resultados para TR e DR respectivamente, 18,48 MPa e 62,35%. Os filmes elaborados por esses autores possuem uma melhor capacidade de alongação quando comparado aos dados do presente trabalho. A alongação na ruptura pode ser definida como a capacidade máxima na qual um filme pode esticar-se antes da quebra (OZDEMIR; FLOROS, 2008).

A DR das amostras foi determinada para estimar a extensibilidade dos filmes antes de se romperem. Praticamente não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Todos os filmes apresentaram valores inferiores a filmes sintéticos e também a filmes feitos a base de proteína de soja, de glúten de trigo (GENNADIOS, *et al.*, 1994) e também de zeína de milho

(PADUA; WANG 2002). Porém Phan *et al.*, (2005) relataram que em geral, filmes a base de ágar tendem a apresentar resultados satisfatórios nas propriedades mecânicas devido a sua estrutura polimérica compacta e homogênea quando comparados a filmes de amido de arroz comum e amido de arroz ceroso.

Como pode ser visto, as propriedades mecânicas relatadas nas literatura para filmes à base de PS são variáveis e são atribuídas principalmente a diferentes quantidades e tipos de polímeros e plastificantes utilizados na formulação dos filmes.

#### **4.4.5 Determinação do coeficiente de espalhamento**

Como citado anteriormente, antes de analisar a capacidade molhante dos revestimentos de PS nos exemplares de camarão descascados e sem cabeça, foi necessário determinar a tensão superficial de acordo Zisman (1964). O método dessa avaliação se baseia na observação de uma superfície com uma tensão inferior a 100 mN/m, sendo classificada como uma superfície de baixa energia. No presente estudo, a tensão superficial da superfície dos músculos de exemplares de camarão descascados e sem cabeça foi de 97,93 mN/m, indicando que ela é de baixa energia e podendo portanto, ser adotado um ângulo de contato para a determinação do coeficiente de espalhamento ( $W_s$ ). Alcântara (2015) verificando a tensão superficial no músculo de exemplares de camarões *Litopenaeus vannamei* encontrou um valor abaixo do obtido no presente trabalho, que foi de 59,93 (mN/m).

A eficiência dos revestimentos comestíveis depende principalmente da capacidade molhante da solução formadora do revestimento, afetando nas características finais de espessura do mesmo (PARK, 1999). As formulações de revestimentos comestíveis deverão ter a capacidade de espalhar-se uniformemente na superfície do alimento. Após a secagem, os revestimentos deverão ter uma adesão, coesão e durabilidade adequada (CANEVAROLO JR, 2006). A determinação da capacidade molhante se dá pelo cálculo do coeficiente de espalhamento. O valor do coeficiente de espalhamento ( $W_s$ ) foi obtido pela subtração do trabalho de adesão ( $W_a$ ) menos o trabalho de coesão ( $W_c$ ).

Na Tabela 6 estão dispostos os coeficientes de espalhamento para nove soluções de revestimento a base de PS de *G. birdiae*.

Tabela 5 - Valores da média ( $\pm$  desvio padrão) dos coeficientes de espalhamento ( $W_s$ ) dos filmes de polissacarídeo sulfatado (1,0; 1,5; e 2,0%) obtidos da alga vermelha *Gracilaria birdiae* com diferentes concentrações de glicerol (0,0; 0,1 e 0,2%).

Soluções	PS (m/v)	Glicerol (m/v)	$W_s$ (mN/m)
1	1,0 %	0,0 %	- 6,6998 $\pm$ 1,09 <sup>a</sup>
2	1,5 %	0,0 %	-11,6668 $\pm$ 0,83 <sup>b</sup>
3	2,0%	0,0 %	-16,2554 $\pm$ 1,68 <sup>cd</sup>
4	1,0 %	0,1 %	-10,6844 $\pm$ 0,88 <sup>b</sup>
5	1,5 %	0,1 %	-15,7799 $\pm$ 1,51 <sup>c</sup>
6	2,0%	0,1 %	-18,7281 $\pm$ 2,39 <sup>d</sup>
7	1,0 %	0,2 %	-12,3147 $\pm$ 1,96 <sup>b</sup>
8	1,5 %	0,2 %	-15,9671 $\pm$ 2,24 <sup>c</sup>
9	2,0%	0,2 %	-23,2191 $\pm$ 2,59 <sup>e</sup>

FONTE: AUTOR (2019).

As médias mais o desvio padrão com letras distintas possui diferença estatisticamente significativa entre si pelo teste de Tukey (ANOVA  $p < 0,05$ ).

Foi observado que em concentrações mais elevadas de glicerol menor era a capacidade molhante das soluções em questão. Partindo-se da premissa que quanto mais próximo de zero for o coeficiente de espalhamento, maior será a capacidade da solução filmogênica em revestir o pescado. A solução escolhida foi a que apresentou um valor que mais se aproximou de zero. De acordo com dados obtidos para as soluções a base de PS para revestir os camarões descascados e sem cabeça, a solução adotada foi a de número um que continha 1,0% de PS e 0,0% de glicerol.

Cerqueira *et al.* (2009) caracterizaram a superfície de um queijo e testaram três polissacarídeos como revestimento (quitosana, galactomananas e PS de algas vermelhas) tendo glicerol, sorbitol e óleo como constituintes. Neste trabalho, o revestimento foi otimizado com a determinação dos melhores valores da capacidade molhante. Os resultados demonstraram que as soluções de quitosana com menor concentração de polissacarídeo apresentaram melhores valores de  $W_s$ . No caso dos revestimentos de PS, as soluções com maiores valores de  $W_s$  foram as que continham óleo e dentre estas, a melhor cobertura em termos de capacidade molhante foi uma solução com a seguinte formulação: 1,5% de PS, 0,5% de glicerol e 0,5% de óleo de milho.

#### 4.4.6 Atividade antimicrobiana.

A biodiversidade marinha tem sido reconhecida por ser fonte de compostos com propriedades biológicas diversas. Dentre esses compostos, os polissacarídeos de algas vêm se destacando devido às suas atividades biológicas e sua abundância nos organismos marinhos. Eles apresentam várias atividades biológicas com potenciais benefícios para a saúde, e

aplicações bastante diversificadas na área de alimentos, farmacêutica, biomédica e biotecnológica (DEVILLÉ *et al.*, 2007).

De acordo com OH *et al.* (2008), os polifenóis halogenados presentes nas algas, dentre os quais os bromofenóis, são os compostos majoritariamente responsáveis pela expressiva atividade antimicrobiana, que as algas tem demonstrado. Além dos metabólitos secundários, as algas também apresentam em sua composição química, ácidos, alcalóides e aminas, substâncias que lhes conferem forte atividade antimicrobiana (HELLIO *et al.*, 2000; LAM; HARDER, 2007).

A Tabela 6 demonstra que a concentração de PS testada e o controle utilizado (água) não apresentaram inibição do crescimento bacteriano.

Tabela 6 - Verificação da atividade antimicrobiana através do método de difusão de disco para a concentração de 1,0% de PS extraído da alga vermelha *Gracilaria birdiae* e água destilada estéril (Controle) frente às bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus*) e Gram negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella entérica*).

Concentração	Halo de inibição (mm)			
	<i>Staphylococcus</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Salmonella</i>
	<i>aureus</i> ATCC 25923	<i>parahaemolyticus</i> IOC 18950	<i>coli</i> ATCC 25922	<i>entérica</i> ATCC 13076
Solução filmogênica de PS 1,0%	0	0	0	0
Água destilada estéril (Controle)	0	0	0	0

FONTE: AUTOR (2019).

retirar essa tabela e por ws em itálico

Silva (2009) verificando a atividade antimicrobiana pelo teste do CIM (Concentração Inibitória Mínima) de extratos e frações de *Gracilaria birdiae* frente às bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aereginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella typhi*), também obteve o mesmo resultado do presente estudo, ou seja, todos os extratos e frações testadas não inibiram o crescimento bacteriano.

O resultado obtido do presente estudo também está de acordo com Del Val *et al.* (2001), que realizaram um extenso estudo com macroalgas das três classes provenientes das ilhas Canárias. Eles demonstraram que dentro das classes das Rhodophytas, os extratos metanólicos da ordem Gigartinales (a qual pertence *G. birdiae*) não apresentaram atividade contra um largo espectro de micro-organismos. Além disso, Lima-Filho *et al.*, (2002) testaram o extrato bruto hexânico de outra espécie de alga vermelha, a *Gracillaria domingensis* contra uma série de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos e também não encontraram atividade antibacteriana.

Gressler (2010) verificando a atividade antimicrobiana pelo teste da CIM de substâncias isoladas das algas vermelhas marinhas *Laurencia filiformis*, *Laurencia intricata*, *Plocamium brasilienses* e *Ochtodes secundiramea*, não encontrou atividade antimicrobiana em nenhuma concentração testada.

A concentração de PS utilizada para a avaliação antimicrobiana no presente trabalho pode não ser a suficiente para se obter uma ação bactericida e/ou bacteriostática. Provavelmente em maiores concentrações essa atividade poderia ser detectada, o que torna interessante a continuação dos estudos.

Outro fator que pode ter interferido no presente estudo é o período de coleta das algas. Tal fato foi relatado por Maréchal *et al.* (2004) quando os mesmos verificaram a atividade antimicrobiana de extratos obtidos de *Bifurcaria bifurcata* de acordo com a variação sazonal em *Cobetia marina* e *Pseudoalteromonas haloplanktis*. Foi visto que a máxima atividade antimicrobiana pode ser obtida em algas coletadas entre abril e julho, quando a temperatura da água e a luminosidade apresentam-se mais altas.

Embora ainda sendo considerada pouco relatada a atividade antimicrobiana de algas quando comparada a atividade antioxidante (CABRAL *et al.*, 2011), já existem registros dessa atividade, como descrevem Dubber; Harder (2008), que investigaram os efeitos antimicrobianos dos extratos hexânico e metanólico das algas *Mastocarpus stellatus*, *Laminaria digitata* e *Ceramium rubrum* em 19 bactérias patogênicas de peixes. O extrato metanólico de *C. rubrum* a 10 mg/mL e o extrato hexânico de *L. digitata* a 31 mg/mL demonstraram forte atividade antimicrobiana e inibiram todas as bactérias testadas.

#### **4.5 Determinação das perdas de peso, de glaciamento e de revestimento.**

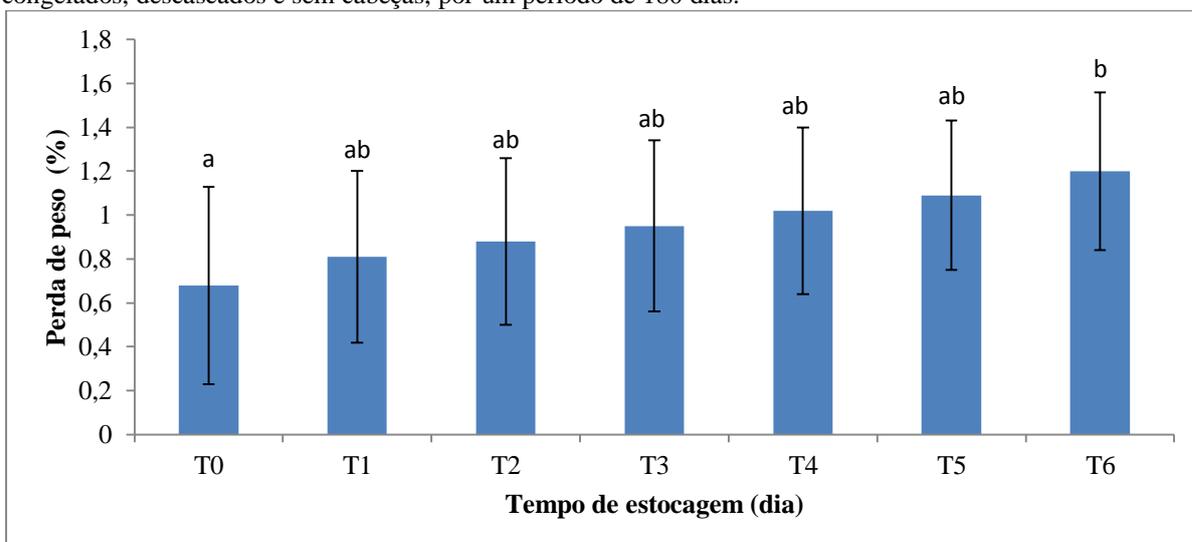
O melhoramento das tecnologias de conservação de alimentos perecíveis vem sendo uma das principais preocupações na indústria de pescado, que buscam um produto final

com boa qualidade. Entre os processos utilizados, os mais importantes são os que se baseiam na ação de baixas temperaturas, como por exemplo, o congelamento, preservando as características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas (GONÇALVES; GINDRI JUNIOR, 2009). No entanto, vale enfatizar que estes métodos de preservação que utilizam baixas temperaturas são eficientes, porém não melhoram a qualidade do produto. A qualidade final do pescado depende do estado em que o mesmo se encontra no momento do congelamento. Produtos congelados podem ter vida de prateleira superior a um ano, se manuseados de forma adequada (MAIA; PEREIRA, 2011; MANSO *et al.*, 2013).

No entanto, mesmo congelado, o camarão continua sendo um produto sensível, através de processos de perda de qualidade durante o armazenamento, como a perda de peso por desidratação (perda de água por sublimação) (GONÇALVES, 2005). A perda de peso é um dos indicadores físicos mais importantes para avaliar a qualidade de um pescado, pois a mesma pode causar alteração na textura, na aparência e no sabor (FARAJZADEH *et al.*, 2016). Portanto, a avaliação desse parâmetro é de grande importância econômica já que o pescado é vendido por peso (HUFF-LOBERGAN; LONERGAN, 2005).

Os dados referentes a perda de peso do estudo em questão estão contidos na Figura 14. Para o primeiro dia foi observada uma perda de peso de 0,68%, e essa perda de peso tornou-se crescente até os 180 dias de análise, chegando a 1,20% em relação ao peso inicial. Praticamente não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tempos de estocagem, ocorrendo somente entre o  $T_0$  e o  $T_6$ .

Figura 14- Perda de peso para o grupo controle (CSR) dos exemplares de camarão *Litopenaeus vannamei* congelados, descascados e sem cabeças, por um período de 180 dias.



FONTE: AUTOR (2019).

As médias mais o desvio padrão com letras distintas possui diferença estatisticamente significativa entre si pelo teste de Tukey (ANOVA  $p < 0,05$ ).

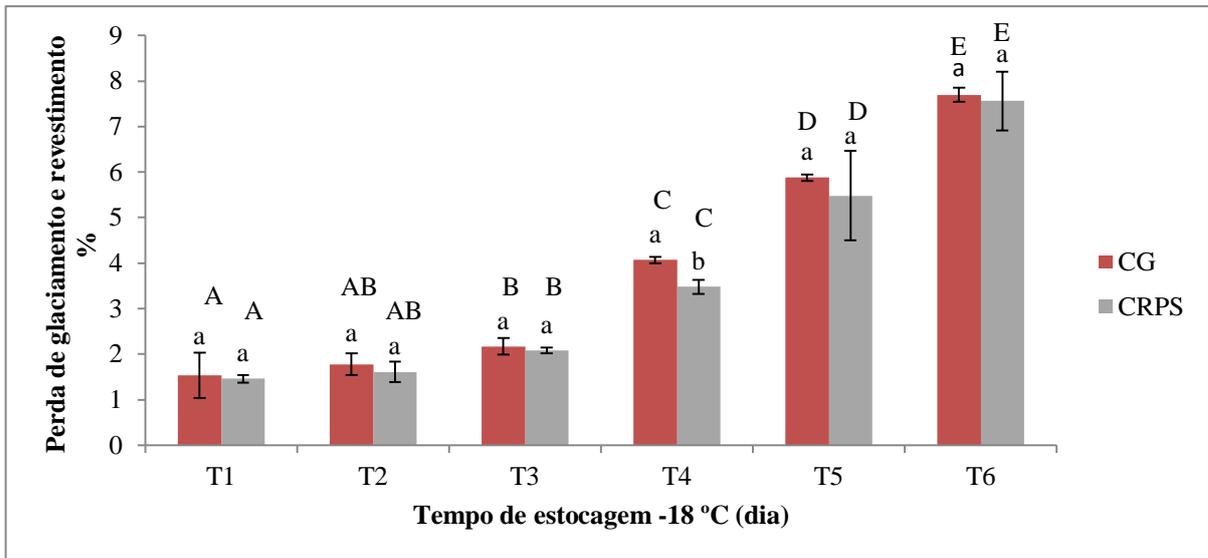
Buscando evitar alterações bioquímicas, que depreciam o pescado congelado, a indústria utiliza tecnologias como o glaciamento para proteger o produto e evitar o excessivo contato com o ar atmosférico, retardando assim, a perda de umidade e a oxidação lipídica (LIN; LIN, 2005; VANHAECKE; VERBEKE; BRADANDER, 2010).

Entende-se por glaciamento o processo de cobrir o produto com uma camada de gelo, que pode ter diferentes espessuras. Esse tratamento pode ser realizado pela imersão ou pulverização de água gelada, com ou sem aditivos, no pescado congelado individualmente. (NEIVA *et al.*, 2015). Os revestimentos a base de derivados de algas marinhas, como por exemplo, alginatos, carragenanas e ágar também podem ser utilizados como uma espécie de glaciamento (ABDUL KHALIL *et al.*, 2017).

As taxas iniciais de absorção do glaciamento e do revestimento com PS foram de 8,24 e 8,79%, respectivamente. Embora os valores apresentados sejam próximos, pode-se verificar uma maior capacidade de incorporação do revestimento com PS. Pois o ideal é que quanto maior for a taxa de absorção de um dado revestimento, melhor será a ação em proteger o pescado frente aos processos de deterioração, que ocorrem durante a estocagem a frio.

A Figura 15 representa os dados das perdas de glaciamento e de revestimento com PS.

Figura 15 - Perda de glaciamento e de revestimento para os tratamentos (CG e CRPS) dos exemplares de camarão *Litopenaeus vannamei* congelados, descascados e sem cabeças, por um período de 180 dias.



FONTE: AUTOR (2019).

\* Camarão Glaceado (CG) e Camarão Revestido com Polissacarídeo Sulfatado (CRPS). As médias mais o desvio padrão com letras distintas possui diferença estatisticamente significativa entre si pelo teste de Tukey (ANOVA  $p < 0,05$ ).

Após 30 dias ( $T_1$ ) de armazenamento, a perda de glaciamento foi de 1,54% e manteve-se crescente até os 180 dias ( $T_6$ ) de estocagem, chegando a 7,70%, sendo possível verificar uma perda significativa ( $p < 0,05$ ), com relação ao tempo de estocagem. Já a perda de revestimento com PS foi menor, variando de 1,46 ( $T_1$ ) a 7,56% ( $T_6$ ), porém a mesma também apresentou valores crescentes e diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) com relação ao tempo de estocagem.

A relação entre a perda de glaciamento e a perda de revestimento com PS, demonstrou que os tratamentos não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si durante todo o período de estocagem. Embora ambos os tratamentos não tenham apresentado diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), vale ressaltar que a perda de glaciamento apresentou valores mais elevados que a perda de revestimento em todo o período de estocagem conforme Figura 13, portanto, pode-se sugerir que o revestimento de PS, nesse presente estudo, tende a apresentar uma maior capacidade de proteção na conservação de pescados durante a estocagem a  $-18^\circ\text{C}$ , por ter uma menor taxa de perda de revestimento e talvez, utilizando-se concentrações maiores de polímero a perda poderia ser mais significativa. As análises de perda de glaciamento e de revestimento são consideradas bastante importantes, pois de acordo com Pizato *et al.*, (2013), em alimentos revestidos, primeiramente irá ocorrer uma redução na

perda de massa do revestimento, já que o mesmo vai atuar como agente sacrificante, ou seja, o revestimento desidratará primeiro do que o produto alimentício.

#### 4.6 Composição centesimal.

A composição química das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado, descascados e sem cabeça foram submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem e a mesma foi expressa pelos teores de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas, e está representada na Tabela 8.

Tabela 7- Composição química dos exemplares de camarão *Litopenaeus vanammei* congelados, descascados e sem cabeça, submetidos a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.

Parâmetro (%)	Tempo de estocagem (dia)	TRATAMENTO		
		CSR	CG	CRPS
UMIDADE	1	83,42	83,54	83,42
	180	81,34	83,74	83,45
CINZA	1	0,53	0,56	0,63
	180	0,53	0,49	0,58
LIPÍDIO	1	1,71	1,67	1,65
	180	1,52	1,60	1,63
PROTEÍNA	1	13,25	13,43	13,57
	180	13,12	13,27	13,41

FONTE: AUTOR (2019). colocar os desvios e as silgas dos tratamentos

\* Camarão Sem Revestimento (CSR), Camarão Glaceado (CG) e Camarão Revestido com Polissacarídeo Sulfatado (CRPS).

Sabe-se que os constituintes químicos no pescado variam entre diferentes espécies, e mesmo, entre indivíduos de mesma espécie, em função da época e local de captura, *habitat*, sexo, idade, entre outros fatores (STANSBY, 1954; JACQUOT, 1961).

Araújo *et al.* (2012) pesquisando a composição centesimal da mesma espécie de camarão do presente estudo, encontraram os valores médios de: 74,1% de umidade; 1,5% de cinzas; 21,9% de proteínas e 0,3 de lipídios totais. Furuya *et al.* (2006) analisando a composição centesimal do camarão inteiro de água doce *Macrobrachium amazonicum*, detectaram os seguintes valores: 70,3% de umidade, 1,5% de cinzas, 24,8% de proteína e 1,5 para lipídios totais, sendo esse último componente centesimal, foi o que mais se aproximou do presente estudo.

Os valores de umidade do presente estudo foram superiores ao dos já citados anteriormente e são próximos ao trabalho de Pedrosa; Cozzolino (2001) que encontraram

88,34% para o camarão *Penaeus brasiliensis* (in natura). Com relação aos valores de cinza do presente estudo, os mesmos se encontram abaixo dos trabalhos de Araújo *et al.* (2012) e Furuya *et al.* (2006) e também do encontrado por Mohebi; Shahbazi (2017) em amostras de camarão descascados, que relataram o valor de 1,32% de cinzas. Para os teores de proteína bruta total, os do presente estudo estão abaixo do relatado por Silva (2018), que encontrou 16,78 e 17,44% para a mesma espécie de camarão do presente estudo, porém estão superiores ao do Pedrosa; Cozzolino (2001) que detectaram 10,62%. Em relação aos lipídios totais, os encontrados na presente pesquisa são superiores a vários trabalhos, como os de Mohebi; Shahbazi (2017) que detectaram o valor de 0,95%; Solval *et al.* (2014) com a espécie (*Litopenaeus setiferus*) que detectaram 1,12 % e o de Moucherek-Filho; Vaz; Maranhão (2003) que relataram um valor muito baixo para lipídios (0,1%). Porém o valor da presente pesquisa foi igual ao de Furuya *et al.* (2006).

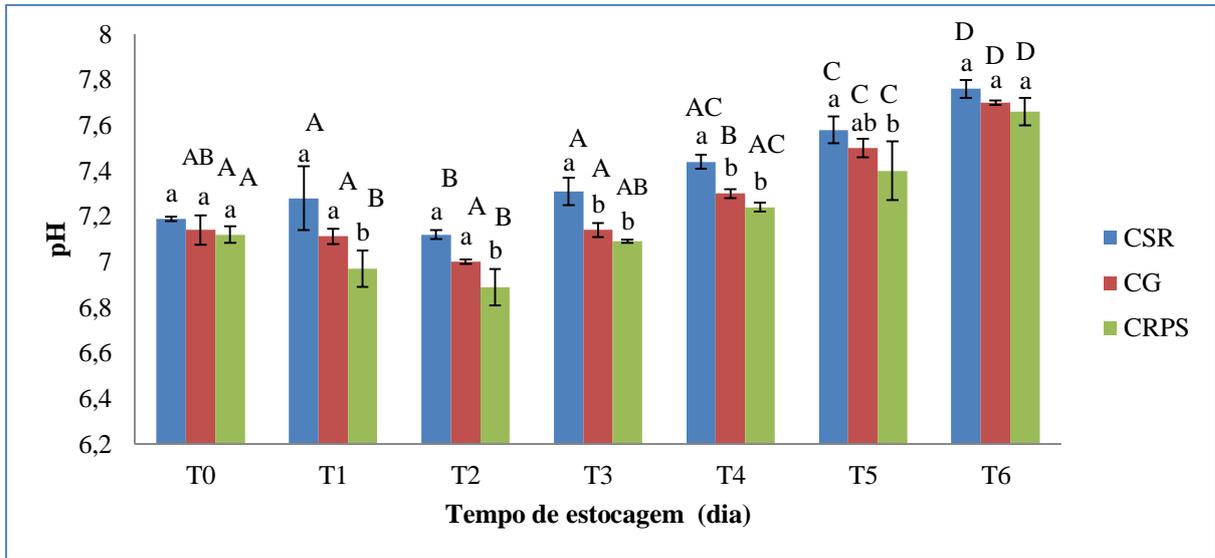
As variações entre os valores obtidos para as características estudadas podem ser atribuídas ao tipo e à disponibilidade do alimento consumido pelos animais (em cativeiro ou ambiente natural) e às regiões do corpo do animal incluídas na análise (animais inteiros, região abdominal ou somente cefalotórax com ou sem casca) (FURUYA *et al.*, 2006).

#### **4.7 Análises físico-químicas dos exemplares de camarão *Litopenaeus vannamei* congelados, descascados e sem cabeça.**

##### **4.7.1 Potencial hidrogeniônico (pH).**

Os valores médios de pH das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado, descascados e sem cabeça, submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem podem ser observados na Figura 16.

Figura 16 - Valores médios de pH dos exemplares de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado, descascado e sem cabeça; submetidos a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.



FONTE: AUTOR (2019).

\* Camarão Sem Revestimento (CSR), Camarão Glaceado (CG) e Camarão Revestido com Polissacarídeo Sulfatado (CRPS). Letras minúsculas diferentes nas colunas dos tratamentos do mesmo dia de estocagem indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (ANOVA  $p < 0,05$ ) entre os tratamentos; Letras maiúsculas diferentes nas colunas dos tratamentos de mesma cor indicam que existe diferença significativa pelo teste de Tukey (ANOVA  $p < 0,05$ ) em relação ao tempo de estocagem.

Os valores de pH dos tratamentos CSR, CG e CRPS apresentaram uma variação de 7,12 a 7,76; 7,0 a 7,7 e 6,89 a 7,66, respectivamente. Assim, percebe-se que as amostras revestidas com revestimento à base de PS apresentaram valores de pH inferiores aos tratamento CSR e CG, durante todo o período de estocagem. Nos tempos de estocagem T1 e T2 o tratamento CRPS se diferenciou estatisticamente dos demais ( $p < 0,05$ ) quanto ao pH. Durante todo o período de estocagem, o tratamento RPS se diferenciou do tratamento CG apenas no tempo T1 e com relação ao tratamento CG, o CRPS se diferenciou nos tempos T1, T2 e T4. Silva (2018) analisando a qualidade de camarão *Litopenaeus vanammei* encontrou o seguinte intervalo de pH, 6,66 a 7,20, respectivamente para o tratamento CSR e para o CG e para os tratamentos submetidos a diferentes concentrações do polissacarídeo quitosana a variação do pH foi de 6,14 a 6,55. Tal fato enfatiza que a utilização de revestimentos comestíveis a base de polissacarídeos tendem a aumentar a vida de prateleira de pescados, baseando-se no fato de que valores altos de pH sugerem um produto não aceitável ao consumo humano.

A carne de crustáceos frescos é considerada adequada para o consumo humano de acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

(RIISPOA), quando o pH for inferior a 7,85 (BRASIL, 2017). Neste contexto, todos os tratamentos apresentaram valores de pH considerados abaixo do limite aceitável de acordo com a legislação vigente, ressaltando que o tratamento CRPS foi o que apresentou os menores valores. Baron; Villanueva (1972) citado por Bertullo (1975) estimaram que o pH do exsudato de camarões considerados bons por uma equipe de degustadores se encontrava entre 6,70 e 7,30, considerando aceitáveis aqueles entre 7,31 e 8,00 e inaceitáveis os que estavam acima de 8,00.

A avaliação do pH tem fundamental importância, pois os valores se elevam em função da produção de compostos nitrogenados voláteis decorrentes da decomposição química e microbiológica no pescado (SIRENO *et al.*, 2014). Porém, deve ser ressaltado que esse parâmetro não deve ser usado de forma isolada na avaliação da qualidade de pescados (SILVA *et al.*, 2016). Mendes *et al.* (2005) relataram que o pH deve ser correlacionado a outros atributos, tais como os sensoriais durante a análise de frescor de pescados para não induzir a uma falsa avaliação. Pois, a qualidade do pescado também pode ser determinada através de outros métodos, tais como os microbiológicos, físico-químicos e os sensoriais (ÖZYURT *et al.*, 2009). No presente estudo, a detecção de tal parâmetro foi associada à de outras análises físico-químicas e microbiológicas.

#### **4.7.2 Nitrogênio das bases voláteis totais (N-BVT)**

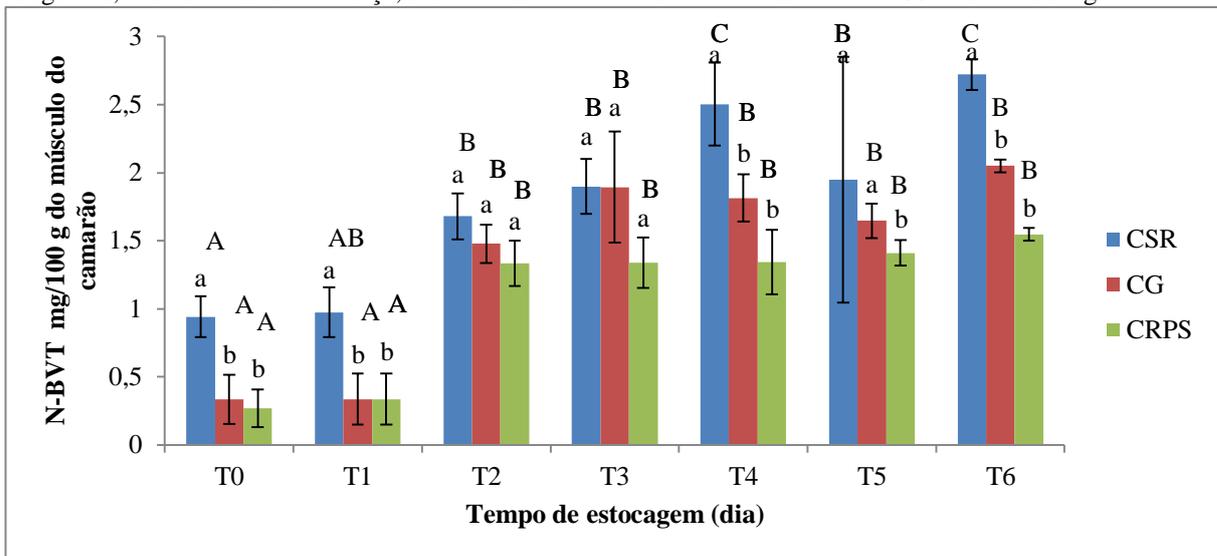
Um dos métodos mais utilizados para a determinação do frescor do pescado é a quantificação do Nitrogênio das Bases Voláteis Totais (N-BVT), pois apresenta uma metodologia analítica simples e um custo ínfimo (MALLE; POUMEYROL, 1989). As Bases Voláteis Totais (BVT) são originadas do óxido de trimetilamina (OTMA) e dos aminoácidos livres e incluem a amônia, componente majoritário, trimetilamina, dimetilamina e provavelmente traços de monometilamina e propilamina, que são formados em etapas mais avançadas da decomposição (GUZMÁN, 1994). A produção destas bases voláteis totais se dá pela ação de enzimas endógenas do pescado e/ou por ação bacteriana. Isso causa a perda do frescor e o aparecimento dos primeiros sinais de putrefação do peixe (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Apesar de existir uma grande variação no desenvolvimento das BVT entre as distintas espécies, esse método tem uma ampla aplicação, já que pode ser utilizado para espécies de pescado que contêm quantidades pequenas ou nulas de óxido de trimetilamina,

como peixes de água doce, e também para aqueles que têm como característica do processo de deterioração a formação de amônia, sendo o caso dos camarões, elasmobrânquios e polvo (HUSS, 1995).

Os valores de N- BVT (mg/100g) dos exemplares de camarão *Litopenaeus vanammei* congelados, descascados e sem cabeça, submetidos a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem podem ser visualizados na Figura 17.

Figura 17 - Valores médios de N- BVT (mg/100g) dos exemplares de camarão *Litopenaeus vanammei* congelado, descascado e sem cabeça; submetidos a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.



FONTE: AUTOR (2019).

\* Camarão Sem Revestimento (CSR), Camarão Glaceado (CG) e Camarão Revestido com Polissacarídeo Sulfatado (CRPS). Letras minúsculas diferentes nas colunas dos tratamentos do mesmo dia de estocagem indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (ANOVA  $p < 0,05$ ) entre os tratamentos; Letras maiúsculas diferentes nas colunas dos tratamentos de mesma cor indicam que existe diferença significativa pelo teste de Tukey (ANOVA  $p < 0,05$ ) em relação ao tempo de estocagem.

Nos tempos de estocagem T0, T1, T4 e T6, o tratamento CRPS se diferenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) do tratamento CSR em relação aos valores de N-BVT. Entretanto, com relação ao tratamento CG, o CRPS não se diferenciou significativamente ( $p < 0,05$ ).

Os tratamentos CSR e CG apresentaram valores próximos, que foram, respectivamente, uma variação de 0,94 a 2,72 mg de N/100g e 0,33 a 2,04 mg/100g. E o tratamento CRPS apresentou valores mais baixos com uma variação de 0,26 a 1,41 mg de N/100g. Os níveis de BVT das amostras de camarão *Litopenaeus vanammei* congelados, descascados e sem cabeça, nos três tratamentos, estão bem abaixo da faixa aceitável pela legislação brasileira para pescado fresco que estabelece um valor inferior a 30mg de N/100g de carne (BRASIL, 2017). Os valores baixos de N-BVT encontrados no presente estudo

podem ser devido às boas condições iniciais de frescor dos exemplares de camarão analisados, bem como uma temperatura ideal durante o seu período de estocagem a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Queiroga *et al.*, 2014 analisando amostras de camarão *Litopenaeus vannamei* submetidas a três tipos 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 variando de 4,14 a 14,45 (nitrogênio líquido); 3,69 a 16,02 (túnel de congelamento) e 6,01 a 15,93 (freezer doméstico), sem apresentar diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos, mostrando que os três tipos de congelamento conservam o frescor do camarão até o final do seu período de armazenamento. Bono *et al.* (2012) avaliaram os níveis de BVT durante a estocagem a  $-18^{\circ}\text{C}$  e observaram resultados de até 86 mgN/100g após oito meses de estocagem. Tsironi *et al.* (2009) encontraram valores de até 25 mgN/100g após oito meses em camarão armazenado a  $-15^{\circ}\text{C}$ . Os trabalhos citados anteriormente sugerem que quanto maior a temperatura de estocagem, mais elevados tendem a ser os valores de N-BVT.

Silva (2018) ao avaliar a qualidade de camarão *Litopenaeus vannamei* congelado, obteve resultados semelhantes ao do presente estudo, ou seja, os camarões tratados com diferentes concentrações de uma solução filmogênica a base de polissacarídeo (quitosana) apresentaram os menores valores de N-BVT durante a estocagem por 180 dias.

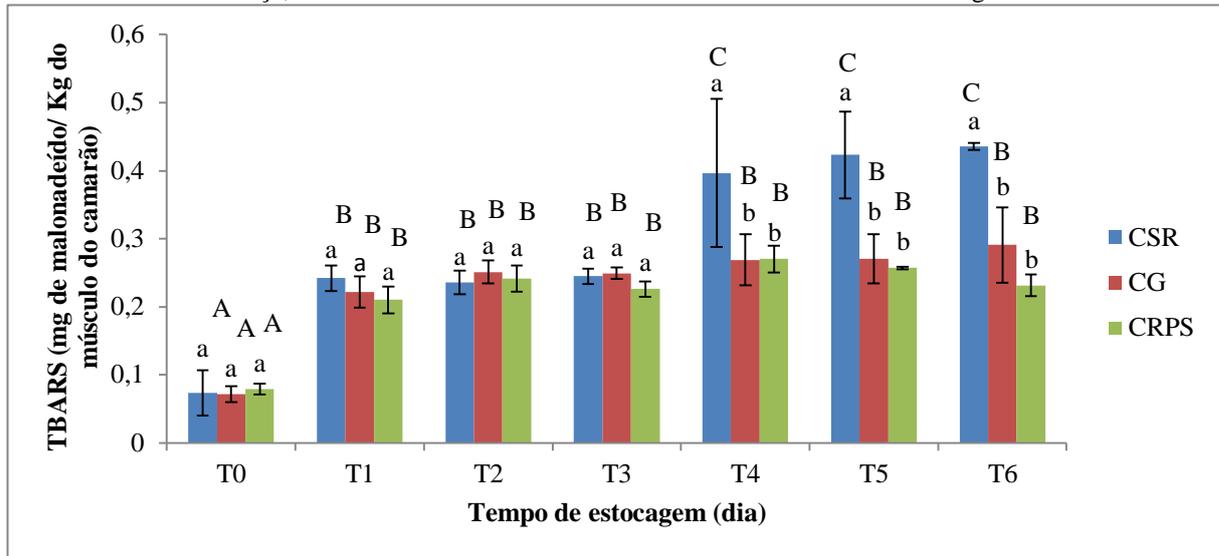
#### **4.7.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

A oxidação de lipídios ocorre quando elétrons são removidos de um átomo ou um grupo de átomos, ou seja, dá-se pela perda de elétrons durante a transferência destes de uma substância a outra, um de cada vez ou em pares. Essa reação é causada pelo oxigênio atmosférico, menos frequentemente por ozônio, peróxido, metais e outros agentes oxidantes. A oxidação lipídica leva à formação de radicais livres, promovendo alterações de diversas propriedades, principalmente as sensoriais (sabor, aroma, textura e cor) (ARAÚJO, 1995).

A velocidade da reação de oxidação depende do grau de insaturação na molécula do ácido graxo. Quanto maior é o grau de insaturação, maior é a suscetibilidade à oxidação. O elevado grau de insaturação das gorduras do pescado, o torna bastante suscetível à oxidação, tornando-o um produto rançoso. Isso acarreta alterações não apenas no sabor, mas também pode apresentar riscos associados à formação de peróxidos resultantes da degradação. Pois rancificação produz um cheiro forte e um sabor acre (OETTERER, 1998; OGAWA, 1999).

Os valores de TBARS dos exemplares de camarão *Litopenaeus vanammei* congelados, descascados e sem cabeça, submetidos a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem podem ser visualizados na Figura 18.

Figura 18 - Valores médios de TBARS dos exemplares de camarão *Litopenaeus vanammei* congelados descascados e sem cabeça, submetidos a diferentes tratamentos durante 180 dias de estocagem.



FONTE: AUTOR (2019).

\* Camarão Sem Revestimento (CSR), Camarão Glaceado (CG) e Camarão Revestido com Polissacarídeo Sulfatado (CRPS). Letras minúsculas diferentes nas colunas dos tratamentos do mesmo dia de estocagem indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (ANOVA  $p < 0,05$ ) entre os tratamentos; Letras maiúsculas diferentes nas colunas dos tratamentos de mesma cor indicam que existe diferença significativa pelo teste de Tukey (ANOVA  $p < 0,05$ ) em relação ao tempo de estocagem.

Durante todo o período de estocagem o tratamento CG não se diferenciou significativamente do CRPS, o que demonstra que revestimentos tendem a ter uma boa capacidade de proteger pescados congelados da oxidação lipídica causada principalmente pelo contato com o oxigênio atmosférico. Nos tempos de estocagem T4, T5 e T6, o tratamento CSR se diferenciou dos demais com o aumento nos valores de TBARS e também durante esse mesmo período de tempo houve a diferença significativa com relação aos outros tratamentos, levando-se em consideração o tempo de estocagem. Os valores de TBARS dos três tratamentos variaram de 0,07 a 0,43 mg MAD / kg. Metodologias que mensurem o ácido tiobarbitúrico (TBA) são extensivamente utilizadas para determinar o nível de oxidação lipídica (OSAWA *et al.*, 2005). A legislação brasileira não exige limite estabelecido para TBARS, porém conforme citado Silva (2018), o produto pode ser considerado em bom estado para consumo quando o mesmo apresenta valores abaixo de 3,0 mg MAD/kg de amostra, sendo que segundo este mesmo autor os limites de oxidação lipídica para o consumo são de 7

a 8 mg MAD/kg no alimento. Neste contexto, os resultados encontrados de TBARS (Figura 18) no presente estudo, para todos os tratamentos, ficaram dentro dos valores considerados aceitáveis durante todo o período de armazenamento.

Silva (2018) pesquisando a qualidade de camarão *Litopenaeus vannamei* congelado apresentou resultados diferentes ao do presente estudo, pois os exemplares de camarão que foram tratados com o polissacarídeo quitosana apresentaram maiores valores de TBARS. Já Queiroga *et al.* (2014) avaliando parâmetros de qualidade em amostras de camarão (*Litopenaeus vannamei*) congelado durante 90 dias de estocagem encontraram valores próximos ao do presente estudo (0,01 a 0,03 mg de malonaldeído / kg de camarão). Kirschnik; Viegas (2004) pesquisando alterações na qualidade do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* durante estocagem em gelo, também detectaram valores baixo como os do presente estudo.

#### **4.8 Contagem de Bactérias Psicotróficas nos exemplares de camarão *Litopenaeus vannamei* congelados, descascados e sem cabeça durante 180 dias de estocagem.**

Os resultados da média do logaritmo decimal das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de bactérias psicotróficas detectadas no músculo do camarão (*Litopenaeus vannamei*) estão detalhados na Tabela 9.

Tabela 8 - Logarítmo da Media dos valores das Unidades Formadoras de Colônias das bactérias psicotróficas detectadas no músculo de exemplares de camarão *Litopenaeus vannamei* congelados, descascados e sem cabeça, durante 180 dias de estocagem.

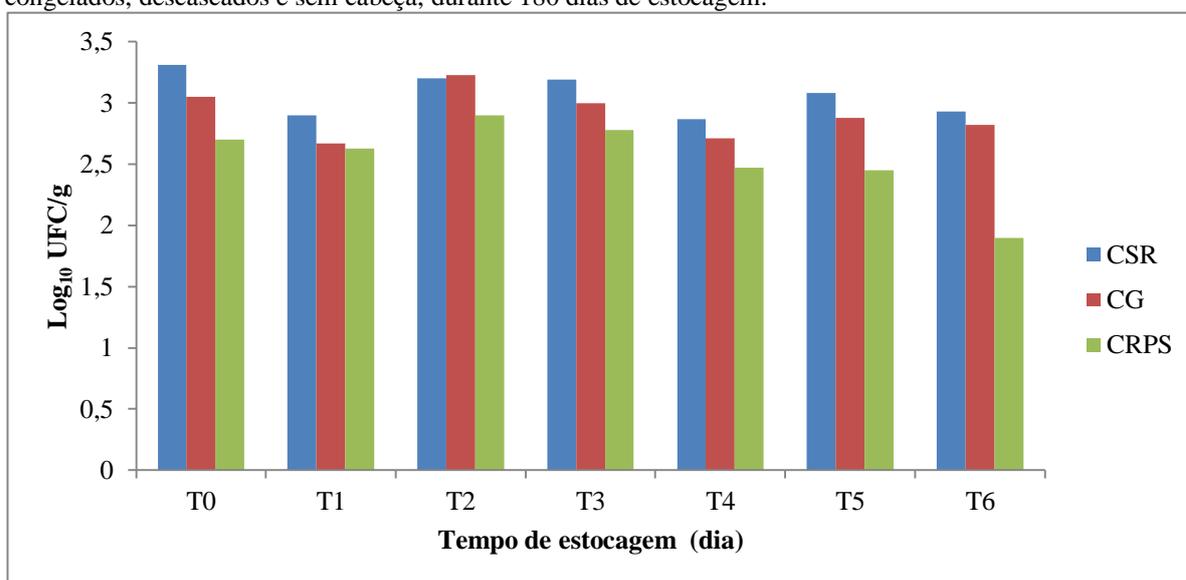
<b>TEMPO DE ESTOCAGEM</b>	<b>TRATAMENTO</b>	<b>MÚSCULO (UFC/g)</b>
<b>T<sub>0</sub></b>	<b>CSR</b>	<b>3,31</b>
	<b>CG</b>	<b>3,05</b>
	<b>CRPS</b>	<b>2,70</b>
<b>T<sub>1</sub></b>	<b>CSR</b>	<b>2,90</b>
	<b>CG</b>	<b>2,67</b>
	<b>CRPS</b>	<b>2,63</b>
<b>T<sub>2</sub></b>	<b>CSR</b>	<b>3,20</b>
	<b>CG</b>	<b>3,23</b>
	<b>CRPS</b>	<b>2,90</b>
<b>T<sub>3</sub></b>	<b>CSR</b>	<b>3,19</b>
	<b>CG</b>	<b>3,00</b>
	<b>CRPS</b>	<b>2,78</b>
<b>T<sub>4</sub></b>	<b>CSR</b>	<b>2,87</b>
	<b>CG</b>	<b>2,71</b>
	<b>CRPS</b>	<b>2,47</b>
<b>T<sub>5</sub></b>	<b>CSR</b>	<b>3,08</b>
	<b>CG</b>	<b>2,88</b>
	<b>CRPS</b>	<b>2,45</b>
<b>T<sub>6</sub></b>	<b>CSR</b>	<b>2,93</b>
	<b>CG</b>	<b>2,82</b>
	<b>CRPS</b>	<b>1,90/est.</b>

FONTE: AUTOR (2019).

\* Camarão Sem Revestimento (CSR); Camarão Glaceado (CG); Camarão Revestido com Polissacarídeo Sulfatado (CRPS); est.: estimada (contagem bacteriana fora do intervalo adotado).

A variação expressa em logaritmo do número de bactérias psicotróficas no músculo dos exemplares de camarão *Litopenaeus vannamei* congelados, descascados e sem cabeça foi de 1,90/est. a 3,31, para os três tratamentos. O intervalo desta contagem para os tratamentos CSR, CG e CRPS foram, respectivamente, 2,87 a 3,31; 2,67 a 3,23 e 1,9/est. a 2,90. Pode-se perceber de acordo com a Figura 18 que a menor contagem ficou para o tratamento CRPS. Tal fato sugere que o PS utilizado no presente trabalho apresentou uma ação bacteriostática e/ou bactericida nos exemplares de camarão.

Figura 19 – Quantificação de bactérias psicotróficas em exemplares de camarão *Litopenaeus vannamei* congelados, descascados e sem cabeça, durante 180 dias de estocagem.



FONTE: AUTOR (2019).

\* Camarão Sem Revestimento (CSR), Camarão Glaceado (CG) e Camarão Revestido com Polissacarídeo Sulfatado (CRPS).

Embora no Brasil não haja legislação que estabeleça limites máximos de contagens de bactérias heterotróficas totais (mesófilas, psicotróficas e psicófilas) para pescado, 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). Dentro desse contexto, todos os tratamentos (CSR, CG, CRPS) apresentaram contagens abaixo do limite estabelecido durante todo o período de estocagem.

Em 1978 a Comissão Nacional de Normas e Padrões Alimentares na Resolução de nº13, adotou limites máximos de CPP de  $10^6$  UFC/g em pescados crus, frescos, refrigerados ou congelados (BRASIL, 1978). Porém, tal fato foi questionado por vários autores (SIMMONDS; LAMPRECHT, 1980; VIEIRA, 1986) e após várias avaliações microbiológicas em pescados tais autores chegaram à conclusão que esse valor não seria adequado e desde 1987 esta contagem não é mais utilizada como parâmetro para avaliação microbiológica da qualidade de pescados (BRASIL, 1987). Entretanto, deve-se enfatizar que a mesma ainda é bastante realizada com o intuito de se obter informações quantitativas e qualitativas na área de processamento de diversos alimentos.

Cerqueira *et al.* (2009) ao pesquisarem polissacarídeos funcionais (quitosana e PS extraídos de *Gracilaria triacanthos* e *Gracilaria birdiae*) como revestimentos comestíveis

aplicados em queijos, verificaram visualmente que após 48 horas do início do experimento as amostras de queijo começaram a apresentar crescimento fúngico em suas superfícies. A avaliação visual confirmou que as amostras de queijo, que não foram revestidas com os polissacarídeos, apresentaram crescimento em quase toda a superfície. As amostras revestidas com o PS extraído da alga vermelha *Gracilaria triacanthos* demonstraram uma maior inibição no crescimento de fungos, quando comparadas as amostras de queijo não revestidas.

O consumo de pescados aumentou nos últimos anos, à medida que os consumidores se tornaram mais conscientes de seus benefícios nutricionais e dos problemas de saúde associados a outros produtos como frango e carne bovina. No entanto, a composição química dos pescados torna-o favorável para um rápido crescimento e propagação de microorganismos deteriorantes e patógenos comuns de origem alimentar (SHOKRI; EHSANI; JASOUR, 2015). Diante do exposto, a utilização dos parâmetros de qualidade utilizados, incluindo os microbiológicos, na avaliação de pescados, deve ser considerada de grande importância em toda sua cadeia produtiva.

## 5 CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que o filme comestível de PS da alga marinha vermelha *G. birdiae* elaborado no presente estudo, apresentou um grande potencial como revestimento comestível. Pois o mesmo apresentou boas características termoestáveis e também mecânicas, indicando a sua aplicação na formação de biomateriais.

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 que o tratamento CRPS apresentou os melhores valores em termos de frescor. Tal ocorrência sugere a utilização do PS no aumento da vida de prateleira de pescados resfriados. Principalmente devido ao fato de que estes PS podem ser considerados, de um modo geral, macromoléculas seguras, não-tóxicas, biocompatíveis e biodegradáveis, além de possuírem baixo custo de produção e também por não causarem danos ao meio ambiente e ainda podem ser encontradas em abundância na natureza.

## REFERÊNCIAS

- ABCC. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE CAMARÃO. Cultivo do camarão branco quebra paradigmas (*Litopenaeus vannamei*) do pacífico: quebra de paradigmas, desafios e oportunidades para o fortalecimento do setor pesqueiro e da economia primária do Brasil. Disponível em: <http://abccam.com.br/site/wp-content/uploads/2015/06/Revista-ABCC-edi%C3%A7%C3%A3o-Junho-de-2015.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2017.
- ABCC. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE CAMARÃO. A carcinicultura brasileira em 2003. Revista da ABCC, Recife, ano 6, n.1, 2004.
- ABDUL KHALIL, H. P. S.; TYE, Y. Y.; SAURABH, C. K.; LEH, C. P.; LAI, T. K.; CHONG, E. W. N.; NURUL FAZITA, M. R.; MOHD HAFIIDZ, J.; BANERJEE, A.; SYAKIR, M. I. Biodegradable polymer films from seaweed polysaccharides: A review on cellulose as a reinforcement material. *Express Polymer Letters* Vol.11, N<sup>o</sup>.4, p. 244–265, 2017.
- AHMADI, A.; MOGHADAMTOUSI, Z. S.; ABUBAKAR, S.; ZANDI, K. Antiviral potential of algae polysaccharides isolated from marine sources: A review *Bio Med Research International*, 2015.
- ALBA, K.; KONTOGIORGOS, V. Seaweed Polysaccharides (Agar, Alginate Carrageenan), University of Huddersfield, Huddersfield, United Kingdom. **Encyclopedia of Food Chemistry**, Volume 1. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21587-4>. Acesso em: 14/02/2019.
- ALCÂNTARA, L. O. **Avaliação de propriedades de superfície de revestimentos aplicados a filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e camarão (*Litopenaeus vannamei*)**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2015.
- ALENCAR, D. B. **Extração, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Lobophora variegata***. 30 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2007.
- ALVES, V.; COSTA, N.; HILLIOU, L.; LAROTONDA, F.; GONÇALVES, M.; SERENO, A.; COELHO, I. Design of biodegradable composite films for food packaging. *Desalination*, v. 199, p. 331-333, 2006.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA PESCA E AQUICULTURA. Ministério da Pesca e Aquicultura. **1º Anuário brasileiro da pesca e aquicultura 2014. 1ST Brazilian fishery and aquaculture yearbook**. Disponível em: [http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/16061/2489520\\_218117.pdf](http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/16061/2489520_218117.pdf). Acesso em: 22 jan. 2016.
- AQUINO, R. S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, A. M.; VALENTE, A. P.; ANDRADE, L. R.; MOURÃO, P. A. S. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. *Glycobiology*, v. 15, n.01, p. 11-20, 2005.

ARCHANA, G.; SABINA, K.; BABUSKINA, S.; RADHAKRISHNANA, K.; FAYIDHA, M. A.; BABU, P. A. S.; SIVARAJAN, M.; SUKUMARA, M. Preparation and characterization of mucilage polysaccharide for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, 98, p. 89–94, 2013.

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.

ARANCIBIA, M.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M.; GÓMEZ-GUILLÉN, 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**, 59 (2), p. 989-995, 2014.

ARAÚJO, D. F. S.; SILVESTRE, D. D.; DAMASCENO, F. K. S. C.; PEDROSA., L. F. C.; SEABRA, L. M. A. J. Composição centesimal e teor de colesterol do camarão branco do Pacífico. **Ciência Rural**, vol. 42, núm. 6, jun. 2012, p. 1130-1133, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil, 2012.

ARAÚJO, G. S.; FARIAS, W. R. L.; RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; PONTES, G. C. Administração oral dos polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Gracilaria caudata* na sobrevivência de pós-larvas de tilápia. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 04, p. 548-554, 2008.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV; 1995.

ARMIS, R. World-wide use and importance of *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology**, 7, p. 231 e 243, 1995.

ARVANITOYANNIS, I.; BILIADERIS, C. G. Physical properties of polyol-plasticized edible films made from sodium caseinate and soluble starch blends. **Food Chemistry**, v. 62 (3), p. 333-342, 1998.

ARVIZU-HIGUERA, D. L.; RODRIGUEZ-MONTESINOS, T. E.; MURILLO-ÁLVAREZ, J. I.; MUÑOZ-UCHOA, M.; HERNÁNDEZ-CARONA, G. Effect of alkali treatment time and extraction time on Ágar from *Glacilaria vermiculophylla*. **Journal of Applied Physiology**, v. 20, p. 515-519. 2007.

ATEF, M.; REZAEI, M.; BEHROOZ, R. Characterization of physical, mechanical, and antibacterial properties of agar-cellulose bionanocomposite films incorporated with savory essential oil. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 150-157, 2015.

ASSIS, O. B. G.; LEONI, A. M. Filmes comestíveis de quitosana. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, jan/jun. 2003.

ASTM-D-3985-02. Standard test method for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a coulometric sensor. In: **Annual book of ASTM**. Amer. Soc. for Testing & Materials, Philadelphia, PA, 2002.

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.

BALDWIN, E. A.; CARRIEDO, M. O. (Ed.). Edible coatings and films to improve food quality. Lancaster (USA): **Technomic Publishing Co.**, p.1-25, 1994.

BARDI, M. A. G.; ROSA, D. S. Avaliação da biodegradação em solo simulado de poli ( $\epsilon$ -caprolactona), acetato de celulose e suas blendas. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, São Paulo, v. 26, n. 1, p.43-47, 2007.

BECKER, C. F.; GUIMARÃES, J. A.; MOURÃO, P. A. S.; VERLI, H. Conformation of sulfated galactan and sulfated fucan in aqueous solutions: implications to their anticoagulant activities. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 26, p. 391-399, 2007.

BERTULLO, V. **Tecnologia de los productos y Subproductos de Pescados, Moluscos y Crustáceos**. Buenos Aires: Ed. Hemisferio Sur, p. 538, 1975.

BEZERRA NETO, J. T. B.; RODRIGUES, J. A. G.; PONTES, G. C.; FARIAS, W. R. L. Polissacarídeos sulfatados da alga *Caulerpa sertularioides* (GMEL.) Howe: Análise de metodologias de precipitação. **Revista Brasileira Engenharia de Pesca**, v. 3, n. 2, p. 50-62, 2008.

BLAXTER, J. H. S.; SOUTHWARD, A. J.; TYLER, P. A. **Advances in Marine Biology**. New York: Academic Press, v. 17, 1999.

BONO, G.; GAI, F.; PEIRETTI, P. G.; BADALUCCO, C.; BRUGIAPAGLIA, A.; SIRAGUSA, G.; PALMEGIANO, G. B. Chemical and nutritional characterisation of the Central Mediterranean Giant red shrimp (*Aristaeomorpha foliacea*): Influence of trophic and geographical factors on flesh quality. **Food Chemistry**, Barking, v. 130, n. 1, p. 104-110, 2012.

BRADFORD, Marion Mckinley. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. p. 248-254. maio, 1976.

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.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicos para Controle de Pescados e seus derivados**. Brasília, DF, 2011.

BRASIL. Ministerio da Saude – Divisao Nacional de Alimentos - DINAL. Portaria no 001 de 28 de janeiro de 1987. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1987.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). **Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes**. Brasília, DF, 1981.

BRASIL. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos – CNNPA. Resolução n° 13 de 1978. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1978.

BURSON, S. L. et al. Isolation and purification of mactins, heparin-like anticoagulants from Mollusca. **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, n. 22, p. 5874-5878, 1956.

CABRAL, I. S. R.; SHIRAHIGUE, L. D.; ARRUDA, L. F.; CARPES, S. T.; OETTERER, M. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante e antimicrobiano. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 29, n. 2, p. 181-192, jul./dez. 2011.

CALLISTER, W. D. **Materials Science and Engineering: An Introduction**. New York, N.Y.: John Wiley and Sons, 2000.

CANEVAROLO Jr., S. V. **Ciência dos Polímeros**, 2ª Edição. Editora Artliber, 2006.

CANEVAROLO, S.V. J. **Técnicas de Caracterização de Polímeros** – Artliber Editora Ltda, São Paulo, 2003.

CARDOZO, K.H.M.; GUARATINI ; T.; BARROS, M.P.; FALCÃO V.R.; TONON, A.P.; LOPES, N.P.; Campos, S.; TORRES, M.A.; SOUZA, A.O.; COLEPICOLO, P.; Pinto, E. Metabolites from algae with economical impact Comp. Biochem. Physiol. Part C: **Toxicological Pharmacological**, 146 (2007), p. 60-78, 2007.

CASARIEGO, A.; SOUZA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; TEIXEIRA, J. A.; CRUZ, L.; DÍAZ, R.; VICENTE, A. A. Chitosan/clayfilms' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles concentrations. **Food Hydrocolloids**, 23, 1895-1902, 2009.

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

CERQUEIRA, M. A., SOUZA, B.W.S., MARTINS, J. T., TEIXEIRA, J. A., VICENTE, A. A. Functional properties of *Gleditsia triacanthos* seeds extracts and their incorporation in to galactomannan films for food applications. In Total Food Sustainability of the Agri-Food Chain; Waldron, K.W, Moates, G. K. and Faulds, C.B., Ed; Cambridge, UK: RSC Publishing, p. 238-243, 2010.

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

CIAN, R. E.; SALGADO, P. R.; DRAGO, S. R.; GONZÁLEZ, R. J.; MAURI, A. N. Development of naturally activated edible films with antioxidant properties prepared from red seaweed *Porphyra columbina* biopolymers. **Food Chemistry**, 146, p. 6–14, 2014.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement**. M100-S23. CLSI: Wayne, v. 33, n.1, p. 20, 2013.

COSTA, L. S.; FIDELIS, G. P.; CORDEIRO, S. L.; OLIVEIRA, R. M. ; SABRY, D. A.; CAMARA, R. B. G.; NOBRE, L. T. D. B.; COSTA, M. S. S. P.; LIMA, J. A.; FARIAS, E. H. C.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 64, p. 21-28, 2010.

COSTA, M. J.; CERQUEIRA, M. A.; RUIZ, H. A.; RICHEL, A.; VICENTE, A. A.; TEXEIRA, J. A.; AGUEDO, M. Use of wheat bran arabinoxylans in chitosan-based films: Effect on physicochemical properties. **Industrial CroAG and Products**. v. 66, p. 305-311, 2015.

CUNHA, P. L. R.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.

CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Functional properties of myofibrillar protein- based biopackagings as affected by film thickness. **Journal Food Science**, 61, 1-5, 1996.

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Edible films and coatings as active layers. In: ROONEY, M.L. **Active food packaging**. Glasgow: Chapman & Hall, p. 111-142, 1995.

DAINELLI, D.; GONTARD, N.; SPYROPOULOS, D.; ZONDERVAN-VAN DEN BEUKEN AND, E.; TOBBACK, P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. S103-S112, 2008.

DAVANÇO, T. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes à base de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou ácido capróico e surfactantes**. Campinas. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, 2006.

DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A.; GUILBERT, S. Procé'de's de Stabilisation des Produits Alimentaires Par les Films "Barrie`re". In *L'eau Dans les Aliments*; Le Meste, M., Lorient, D., Simatos, D., Eds.; Tec and Doc, Lavoisier: Paris, France, 2002; p. 549-600, 2002.

DEL VAL, A. G.; PLATAS, G.; BASILO, A.; CABELLO, A.; GORROCHATEGUI, J.; SUAY, I. Screeninf of antimicrobial actives in red, grenn and Brow macroalgae from Canaria (Canary Islands, Spain) **International Microbiology** 4(1): p. 35-40, 2001.

DEVILLÉ, C.; GHARBI, M.; DANDRIFOSSE, G.; PEULEN, O. Study on the effects of laminarin, a polysaccharide from seaweed, on gut characteristics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 1717-1725, 2007.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulfate content of sulfated polysaccharides. **Biochemistry Journal**, v. 84, n. 1, p.106-110, 1962.

DOWNES, F. P., ITO K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4<sup>th</sup> ed. Washington – DC: APHA, p-676, 2001.

DUBBER, D.; HARDER, T. Extracts of *Ceramium rubrum*, *Mastocarpus stellatus* and *Laminaria digitata* inhibit growth of marine and fish pathogenic bacteria at ecologically realistic concentrations. **Aquaculture**, v. 274, n. 1, p. 196-200, 2008.

DUBOIS, M.; K. A. GILLES; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p.350-356, 1956.

EUGENE, K., Chitin: a biomaterial in waiting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6(4): p. 313-317, 2002.

FALGUERA, V., QUINTERO, J. P., JIMÉNEZ, A., MUÑOZ, J. A., IBARZ, A. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. **Trends in Food Science & Technology**, 22, p. 292–303, 2011.

FAKHOURI, F. M.; WATANABE, K. M.; BEPPU, M. M.; COLLARES, F. P. Estudo da influência da concentração de proteína em filmes de gelatina plastificados com sorbitol. In: **SLACA – Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**. Disponível em CD-ROM, Campinas, 2005.

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.

FARIAS, W. R. L. Cultivo de algas marinhas no Estado do Ceará. In: **Seminário Nordestino de Pecuária**, 8. Fortaleza, p. 37-38, 2004

FÁTIMA, R.; KHAN, M. A.; QADRI, R. B. Shelf life of shrimp *Penaeus merguensis* stored in ice (0°C) and partially frozen (-3°C). **Journal of Science Food and Agriculture**. 42: 235-247, 1988.

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.

FERREIRA, L. G. **Estrutura química e atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados obtidos de algas do complexo *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta)**. 2011. 217 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2011.

FREILE-PELEGRÍN, Y.; MADERA-SANTANA, T.; ROBLEDO, D.; VELEVA, L.; QUINTANA, P.; AZAMAR, J. A. Degradation of agar films in a humid tropical climate: thermal, mechanical, morphological and structural changes. **Polymer Degradation and Stability**, 92, p. 244-252, 2007.

FURUYA, W. M.; HAYASHI, C.; SILVA, A. B. M. S.; JÚNIOR, O. O. S.; SOUZA, N. E. S.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V. Composição centesimal e perfil de ácidos graxos do camarão d'água-doce. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1577-1580, 2006.

GADE, R.; TULASI, M. S.; BHAI, V. A. Seaweeds: A novel biomaterial. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 5, p. 40–44, 2013.

GARCÍA, M. A.; MARTINO, M.; N., ZARTIZKY, N. E. Microstructural characterization of plasticized starch-based films. *Starch/Stärke*, 52(4), p. 118-124, 2008.

GARCIA, R. B.; VIDAL, R. R. Preparation and Structural Characterization of O-Acetyl Agarose with Low Degree of Substitution. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.10, n.3, p.155-161, 2000.

GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F. Modification of Physical and Barrier Properties of Edible Wheat Gluten-based Films. **Cereal Chemical**, 70, 426-429, 1993.

GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; GOODING, C. H. Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable hydrophilic edible films. **Journal Food Engineering**, 21, p. 395-409, 1994.

GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ DE LACEY, A.; PÉREZ-SANTÍN, E.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, P. Release of active compounds from agar and agar-gelatin films with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, 30 264-271, Madrid, Spain, 2013.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; DE QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G. L.; VAN DEN BERG, C. **Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil**. Megadiversidade, v. 1, n. 1, p. 52-61, 2005.

GNANASAMBADAM, R.; HETTIARACHCHY N.S.; COLEMAN, M. Mechanical and barrier properties of rice bran films. **Journal Food Science**, 62, 395–398, 1997.

GONÇALVES, A. A. **Estudo do processo de congelamento do camarão associado ao uso do aditivo fosfato**. 170 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2005.

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, jul. 2009.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1813-1827, 2011.

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.

GREENER-DONHOWE, I.; FENNEMA, O. Edible Films and Coatings: Characteristics, Formation, Definitions, and Testing Methods. In *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*; Krochta, J. M., Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M., Eds.; Technomic Publishing: Lancaster, PA; p. 1-24, 1994.

GRESSLER, V. **Composição química e potencial biotecnológico das algas vermelhas marinhas** *Laurencia filiformis*, *Laurencia intricata*, *Polcamium brasiliense* e *Ochtodes*

*secundiramea da costa brasileira*. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. São Paulo, 2010.

GUERRERO, P., ETXABIDE, A., LECETA, I., PEÑALBA, M., DE LA CABA, K. Extraction of agar from *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta) and surface characterization of agar based films. **Carbohydrate Polymers**. 99, p. 491– 498, 2014.

GUILBERT, S.; GONTARD, N.; MOREL, M. H.; CHALIER, P.; MICARD, V.; REDL, A. Formation and Properties of Wheat Gluten Films and Coatings. In *Protein-Based Films and Coatings*; Gennadios, A., Ed.; CRC Press: New York, p. 69-122, 2002.

GUZMÁN, E. S. C. **Bioquímica de Pescados e Derivados**. Jaboticabal: FUNEP, p. 409, 1994.

GUO, J. H.; SKINNER, G. W.; HARCUM, W. W.; BARNUM, P. E. Pharmaceutic applications of naturally occurring water-soluble polymers. **Pharmaceutical science & technology today**, v. 1, n. 6, p. 254-261, 1998.

HAN, C.; LEDERER, C.; MCDANIEL, M.; ZHAO, Y. Sensory Evaluation of Fresh Strawberry (*Fragariaananassa*) Coated with Chitosan-based Edible Coatings. **Journal of Food Science**. v. 70, n.3, 2005.

HELLIO, C.; BREMER, G.; PONS, A.M.; LE GAL, Y.; BOURGOUGNON, N. Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany, France. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 4, p. 543-549, 2000.

HOLDT, S. L.; KRAAN, S. Bioactive compounds in seaweed functional food applications and legislation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 543-597, 2011.

HONG, Y. H., LIM, G. O., SONG, K. B. Physical properties of *Gelidium corneum* - gelatin blends films containing grapefruit seed extract or green tea extract and its application in the packaging of pork loins. **Journal of Food Science**, 74(1), C6 e C10, 2009.

HOTCHKISS, S.; TRIUS, A. **Seaweed the new “superfood”?** R. Gormley, F. Holm (Eds.), Functional foods: Some pointers for success, UCD Institute of Food and Health, Dublin , 2010.

HUFF-LONERGAN, E.; LONERGAN. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. **Meat Science**. v. 79, p.194-204, 2005.

HUQ, T.; SALMIERI, S.; KHAN, A.; KHAN, R. A.; TIEN, C. L.; RIEDL, B.; FRASCHINI, C.; BOUCHARD, J.; URIBE-CALDERON, J. Kamal M. R., Lacroix M.: Nanocrystalline cellulose (NCC) reinforced alginate based biodegradable nano - composite film. **Carbohydrate Polymers**, 90, 1757–1763, 2012.

HUNER, J. V.; BROWN, E. **Crustacean and Mollusk Aquaculture in the United States**. New York: An AVI Book, 1985.

HUSS, H. H. Quality and quality changes in fresh fish. Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations, **Fisheries Technical Paper**, n.348. p. 195, 1995.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4. ed. São Paulo, 2008.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). Micro-organisms in foods 2. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications. University of Toronto Press, Toronto, 1986.

JACQUOT, R. Organic Constituents of Fish and Other Aquatic Foods. In: BORGSTROM, G. (Ed.), **Fish Food**. London: Academic Press, v. 1, p. 145-210, 1961.

JASSE, B.; SEUVRE, A. M.; MATTHLOUTHI, M. Permeability and structure in polymeric packaging materials in food packaging and preservation. London : Mathlouthi, p. 122, 1994.

KAKAEI, S.; SHAHBAZI, Y. Effect of chitosan-gelatin film incorporated with ethanolic red grape seed extract and Ziziphora clinopodioides essential oil on survival of *Listeria monocytogenes* and chemical, microbial and sensory properties of minced trout fillet. **Food Science and Technology**, 72, p. 432-438, 2016.

KILINÇ, B.; CIRIK, S.; TURAN, G.; TEKOGUL, H.; KORU, E. Seaweeds for Food and Industrial Applications, 2013. Disponível Em: [http://cdn.intechopen.com/pdfs/41694/InTechSeaweeds\\_for\\_food\\_and\\_industrial\\_applications.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/41694/InTechSeaweeds_for_food_and_industrial_applications.pdf). Acesso em: 27.02.2019.

KIRSCHNIK, P. G.; VIEGAS, E. M. M. Alterações na qualidade do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* durante estocagem em gelo. *Ciências Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 24(3): 407-412, jul-set. 2004.

KOLYBABA, M.; TABIL, L. G.; PANIGRAHI, S.; CRERAR, W. J.; POWELL, T.; WANG, B. **Biodegradable Polymers: Past, Present, and Future**. CSAE/ASAE Annual Intersectional Meeting Sponsored by the Red River Section of ASAE Quality Inn & Suites 301 3rd Avenue North Fargo, North Dakota, USA October, p. 3-4, 2008.

KROCHTA, J. M., DE MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, v. 51, n. 2, p. 6074, 1997.

KROCHTA, J. M. Proteins as raw materials for films and coatings: Definitions, Current Status, and Opportunities. In *Protein-Based Films and Coatings*; Gennadios, A., Ed.; CRC Press: New York, p. 1-41, 2002.

KU, K. J.; HONG, Y. H.; SONG, K. B. Mechanical properties of a *Gelidium corneum* edible film containing catechin and its application in sausages. **Journal of Food Science**, 73 (3), C 217 e C 221; 2008.

KWOK, D. Y.; NEWMAN, A. W. Contact angle measurement and contact angle interpretation. **Advances in Colloid and interface Science**, vol. 81, n. 3, p. 167-249, 1999.

LAOHAKUNJIT N.; NOOMHORN, A. Effect of plasticizer on mechanical and barrier properties of rice starch film. *Starch*, 56, p. 348–356, 2004.

LAVILLA-PITOGO, C. R.; LEAÑO, E. M.; PANER, M. G. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearinr environment. *Aquaculture*, v.164, p.337-349, 1998.

LALITHA, K. V.; SURENDRAN, P. K. Microbiological changes in farm reared freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) in ice. *Food Control*, Oxford, v. 17, n. 10, p. 802-807, out. 2006.

LAM, C.; HARDER, T. Marine macroalgae affect abundance and community richness of bacterioplankton in close proximity. *Journal of Phycology*, v. 43, n. 1, p. 874-881, 2007.

LIN, C. C.; LIN, C. S. Enhancement of the storage quality of frozen bonito fillets by glazing with tea extracts. *Food Control*, 16 (2): p.169-175, 2005.

LIMA, S. L. T. Reciclagem e biodegradação de plásticos. *Revista Científica do IMAPES*, Sorocaba, v. 2, n. 2, p. 28-34, 2004.

LIMA, P. C. W. C. **Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Spatoglossumshroederi* sobre o aumentoda resistência do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* submetido a situações de estresse.** 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2007.

LIMA-FILHO, J. V. M.; CARVALHO, A. F. F. U.; FREITAS, S. M., MELO V. M. M. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian coast. Braz. *Journal Microbiology*, 33: p. 311, 2002.

LIU, C. H.; CHENG, W.; HSU, J. P.; CHEN, J. C. *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Diseases of Aquatic Organisms*. v. 61, p. 169-17, 2004.

LÓPEZ-RUBIO, A.; ALMENAR, E.; HERNADEZ-MUÑOZ, P.; LAGARÓN, J. M.; CATALÁ, R.; GAVARA, R. Overview of active polymer-based packaging Technologies for food applications. *Food Review International*, v. 20 (4), p. 357-387, 2004.

LORDAN, S.; ROSS; R. P., STANTON, C. Marine bioactives as functional food ingredients: Potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Marine Drugs*, 9, p. 1056-1100, 2011.

MACIEL, J. S., CHAVES, L. S., SOUZA, B. W. S., TEIXEIRA, D. I. A., FREITAS, A. L. P., FEITOSA, P. A. Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Carbohydrate Polymers*, 71, 559e565, 2008.

MADRID, R. M. M. Características intrínsecas e tratamento pós- colheita. In: W. C. Valenti (Editors), Carcinicultura de água doce: **Tecnologia para produção de camarões**, Brasília. p. 279-307, 1998.

MAGALHÃES, K. D. ; COSTA, L. S. ; FIDELIS, G. P. ; OLIVEIRA, R. M. ; NOBRE, L. T. D. B. ; SANTOS, N. D.; CAMARA, R. B. G. ; ALBUQUERQUE, I. R. L ; CORDEIRO, S. L. ; SABRY, D. A. ; COSTA, M. S. S. P.; ALVES, L. G. ; ROCHA, H. A. O. Anticoagulant, Antioxidant and Antitumor Activities of Heterofucans from the Seaweed *Dictyopteris delicatula*. **International Journal of Molecular Sciences** (On line), v. 12, p. 3352-3365, 2011

MAIA, L. R. F. T.; PEREIRA, J. S. Estudo comparativo entre três técnicas de desglaciamento de filé de pescada. **Revista Higiene Alimentar**, v. 25, n. 194/195, p.178-186, mar/abr de 2011.

MAIA, L. H.; PORTE, A.; SOUZA, V. F. Filmes comestíveis: aspectos gerais, propriedades de barreira a umidade e oxigênio. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 105-128, jan./jun.2000.

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 Food Protection**, v. 50 (9), p. 756-760, 1987.

MALI, S.; GROSSMANN, M.V.E.; GARCIA, M.A.; MARTINO, M.N; ZARITZKY, N. E. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. **Journal Food Engineering**, 75, p.453-460, 2006.

MALI, S.; GROSSMANN, M.V.E. Effects of yam starch films on storability and quality of fresh strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton,v.51, v.24, p.7055-7011, 2003.

MANSO, T.; TEXEIRA, L.; CORREIA, P. M. R. Frozen Fish: Control of Glazing Operation. **International Journal of Biological, Food, Veterinary and Agricultural Engineering**. v. 7, n. 7, 2013.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e AbastecimentoSecretaria de Defesa Agropecuária (SDA). **Manual da Garantia da Qualidade Analítica**. 1ª edição, Brasília, 2011.

MARÍA, B.; PÉREZ-GAGO; KROCHTA, J. M. Formation and Properties of Whey Protein Films and Coatings. In *Protein-Based Films and Coatings*; Gennadios, A., Ed.; CRC Press: New York, 2002; p. 159-180, 2002.

MARINHO-SORIANO, E.; MOREIRA, W. S. C.; CARNEIRO, M. A. A. Some aspects of the growth of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in an estuary in northeast Brazil. **Aquaculture International**, 14, p.327-336, 2006.

MARTINI, D. S. **Polímeros derivados do biodiesel do óleo de linhaça: obtenção e propriedades físico-químicas**. Programa De Pós-Graduação Em Química. Instituto de

Química. Universidade Federal do Rio Grande Do Sul (Tese). Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Química. Porto Alegre, Maio/2010.

MARTINS, M. E. O.; SOUSA, J. R.; CLAUDINO, R. L.; LINO, S. C. O.; VALE, D. A.; SILVA, A. L. C.; MORAIS, J. P. S.; SOUZA FILHO, M. S. M.; SOUZA, B. W. S. Thermal and Chemical Properties of Gelatin from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Scale. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, 2018.

MARTINS, P. C. C. **Influência das condições ambientais e das técnicas do manejo de produção sobre a ocorrência de enfermidades no cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, no Estado do Ceará.** Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de São Carlos. São Paulo. p. 117, 2003.

MATHEWS, M. B. Polyanionic proteoglycans. In: KLEINZELLER; SPRINGER, G. F.; WITMANN, H. G. **Connective tissue: macromolecular structure and evolution.** Berlin: Springer-Verlag, p. 93-125, 1975.

MAZUMDER, S.; GHOSAL, P. K.; PUJOL, C. A.; CARLUCCO, M. J.; DAMONTE, E. B.; RAY, B. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). **International Journal of Biological Macromolecules**, 31, p.87-95, 2002.

MCHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Permeability Properties of Edible Films. In *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*; Krochta, J. M., Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M., Eds.; **Technomic Publishing**: Lancaster, PA; p. 139-188, 1994.

MELLO, M. R. S.; FEITOSA, J. P. A.; FREITAS, A. L. P.; DE PAULA, R. C. M. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers**, 49, p. 491 e 498, 2002.

MELO, K.R.T.; ALMEIDA-LIMA, J.; GOMES, D.L.; DANTAS-SANTOS, N.; CAMARA, R.G.B., ROCHA, H.A.O. Caracterização e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marrom *Dictyopteris justii*. **HOLOS**, Ano 28, Vol. 1, 2012.

MENDES, R.; GONÇALVES, A.; PESTANA, J.; PESTANA, C. Índole production and deep water pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) decomposition. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 221, p. 329-335, 2005.

MESTRINER, F. **Design de embalagem** – curso básico. 2ª. ed. São Paulo: Makron Books, 2002.

MILLER, K. S; KROCHTA, J. M. **Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review.** **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p. 228-237, jul. 1997.

MIRANDA, G. E. C.; BEZERRA, C. A. B.; TEIXEIRA, D. I. A. **Cultivo de algas marinhas** Noções básicas. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Abastecimento – FAO, Brasília, 2004.

- MOHEBI, E.; SHAHBAZI, Y. Application of chitosan and gelatin based active packaging films for peeled shrimp preservation: A novel functional wrapping design. **Food Science and Technology**, v. 76, p. 108-116, 2017.
- MOHAJER, S., REZAEI, M., HOSSEINI, S. F. Physico-chemical and microstructural properties of fish gelatin/agar bio-based blend films. **Carbohydrate Polymers**, 157, p. 784–793, 2017.
- MOHAN, C. O.; RAVISHANKAR, C. N.; GOPAL, S. T. K.; LALITHA, K. V.; KUMAR; K. A. Effect of reduced oxygen atmosphere and sodium acetate treatment on the microbial quality changes of seer fish (*Scomberomorus commerson*) steaks stored in ice. **Food Microbiology**, v. 27, p. 526-534, jan. 2010.
- MOLLET, J. C.; RAHAOUI, A.; LEMOINE, Y. Yield, chemical composition and gel strength of agarocolloids of *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima* and the newly reported *Gracilaria cf. vermiculophylla* from Roscoff (Brittany, France). **Journal of Applied Phycology**, 10, p. 59-66, 1998.
- MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends Cardiovascular Medicine**, v. 09, n. 08, p. 225-232, 1999.
- 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.
- NAGAKURA, K. General analysis. In: OKADA, M. (Ed.). Utilization of marine products. Tokyo: Overseas Technical Cooperation Agency, p. 159-169, 1972.
- NEIVA, C. R. P.; MATSUDA, C. S.; MACHADO, T. M.; CASARINI, L. M.; TOMITA, R. Y. Glaciamento em filé de peixe congelado: revisão dos métodos para determinação de peso do produto. **Boletim Instituto da Pesca**, São Paulo, 41(4): p. 899 – 906, 2015.
- NELSON, K. L., FENNEMA, O. R. Methylcellulose films to prevent lipid migration in confectionery products. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 2, p. 504-509, Mar. Apr., 1991.
- NOMURA, I. O futuro da pesca e da aquicultura marinha no mundo. **Ciencia e Cultura**, vol. 62, n° 3, São Paulo, 2010.
- NUGROHO, A., BASITO, K. R. B. Study the manufacture of tapioca edible films with the effect of addition of pectin some type of in banana peels against mechanical and physical characteristics. **Journal Teknosains Pangan** 2 (1): p. 73-79, 2013.
- OETTERER, M. Processamento de surimi – Conhecimento das técnicas de obtenção e de controle da qualidade do produto para a introdução na indústria brasileira. Projeto Programa de Cooperação Internacional CNPq/JAICA. Brasília: CNPq; 1998.
- OGAWA, M; MAIA, E. L. **Manual de Pesca: Ciência e Tecnologia do Pescado**. São Paulo: Livraria Varela, 1999.

OH, K.B.; LEE, J.H.; CHUNG, S.C.; SHIN, J.; SHIN, H.J.; KIM, H.K. Antimicrobial activities of the bromophenols from the red alga *Odonthalia corymbifera* and some synthetic derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, n. 1, p. 104-108, 2008.

OLIVEIRA, L. M.; ALVES, R.M.V.; SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; PADULA, M.; GARCIA, E. E. C.; COLTRO, L. **Ensaios para avaliação de embalagens plásticas flexíveis. Campinas: Centro de tecnologia de embalagem – CETEA**. p. 219, 1996.

OLIVEIRA, P. R.; JESUS, R. S.; BATISTA, G. M.; LESSI, E. Avaliação sensorial, físico – química e microbiológica do pirarucu (*Arapaima gigas*, Schinz, 1822) durante estocagem em gelo. **Brazilian Journal of Food Technology**. v.17, p. 67-74, 2014.

OLIVEIRA, V. P. **Influência da profundidade e dos parâmetros ambientais sobre o desenvolvimento de *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta, Gracilariales) em viveiro de camarão**. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioecologia Aquática, 2007.

ONOFRE, N. A. **Desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos a partir de ágar, agarose e kefirana com incorporação de nanopartículas de prata**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, 2014.

OSAWA, C. C.; AP, P. E. F. L.; GONÇALVES, G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química nova**. v. 28, p. 655-663, 2005.

OUYANG, Q. Q.; HU, Z.; LI, S. D.; QUAN, W. Y.; WEN, L. L.; YANG, Z. M. Thermal degradation of agar: Mechanism and toxicity of products. **Food Chemistry**, 264, p. 277–283, 2018.

OZDEMIR, M.; FLOROS, J.D. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties. **Journal Food Engineering**, 84, 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.

PADUA, G. W.; WANG, Q. Formation and Properties of Corn Zein Films and Coatings. In *Protein-Based Films and Coatings*; Gennadios, A., Ed.; CRC Press: New York, p. 43-67, 2002.

PALMU, P. S. T. **Preparação, propriedades e aplicação de filmes comestíveis à base de glúten de trigo**. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, (UNICAMP); Campinas, p. 244, 2003.

PAINTER, T. J. Algal polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. **The polysaccharides**. New York: Academic Press, 195- 285, 1983.

PARK, H. J. Development of advanced edible coatings for fruits. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 8, p. 254-260, ago. 1999.

PEARSON, D. **General methods – basic constituents**. In:\_. Laboratory techniques in food analysis. New York: John Wiley & Sons, cap. 2, p. 27-77, 1973.

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

PERCIVAL, E.; McDOWELL, R. H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides**. New York: Academic Press, p. 219, 1967.

PERERA, J. G.; MESQUITA, J. X.; ARAGÃO, K. S.; FRANCO, A. X.; SOUZA, M. H. L. P.; BRITO, T. V.; DIAS, J. M.; SILVA, R. O.; MEDEIROS, J. V. R.; OLIVEIRA, J. S.; ABREU, C. M. W.S.; DE PAULA, R. C. M.; BARBOSA, A. L. R.; FREITAS, A. L. P. Polysaccharides isolated from *Digenea simplex* inhibit inflammatory and nociceptive responses. **Carbohydrate Polymers**, v. 108, p. 17–25, 2014.

PÉREZ-RECALDE, M.; MATULEWICZ, M. C.; PUJOL, C. A.; CARLUCCI, M. J. In vitro and in vivo immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from red seaweed *Nemalion helminthoides*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 38-42, 2014.

PEREDA, M.; PONCE, A. G. , MARCOVICH, N. E. ; RUSECKAITE; R. A.; MARTUCCI, J. F. . Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1372-1381, 2011.

PHAN, T. D.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A.; LUU, D. Biopolymer interactions affect the functional properties of edible films based on agar, cassava starch and arabinoxylan blends. **Journal of Food Engineering**, 90, p. 548-558, 2005.

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**, v. 85, n. 18, p. 18-28, out. 2010.

PIZATO, S.; CORTEZ-VEGA W. R.; SOUZA, J. T. A.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; C. D. BORGES. Effects of different edible coatings in physical, chemical and microbiological characteristics of minimally processed peaches (*Prunus persica L. batsch*). **Journal of Food Safety**, v. 33, p. 30-39, 2013.

PLASTINO, E. M.; OLIVEIRA, E. C. *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South American Atlantic with a terete frond and deep spermatangial conceptacles. **Phycologia**, 41, p. 389–396, 2002.

PRADO-FERNÁNDEZ, J.; RODRÍGUES-VÁZQUEZ, J. A.; TOJO, E.; ANDRADE, J. M. Quantitation of k-, i- and l-carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. **Analytica Chimica Acta**, 480, 23e37, 2003.

PRAJAPATI, V. D.; MAHERIYA, P. M.; JANI, G. K.; SOLANKI, H. K. Carrageenan; A natural seaweed polysaccharide and its applications. **Carbohydrat Polymer**. 105, p. 97-112, 2014.

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.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 728, 1996.

RHEIN-KNUDSEN, N.; ALE, M. T.; AJALLOUEIAN, F.; YU, L. Y.; MEYER, A. S. Rheological properties of agar and carrageenan from Ghanaian red seaweeds. **Food Hydrocolloids**, 63, p. 50–58, 2017.

RHIM, J. W., LEE, S. B., HONG, S. I. Preparation and characterization of agar/clay nanocomposite films: the effect of clay type. **Journal of Food Science**, 76 (3), N 40 e N 48, 2011.

RIBEIRO, D. V. **Relatório técnico de atividades desenvolvidas na criação de camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) na empresa Inversões Silma S.A.C., Tumbes, Peru**. 74 f. Relatório de Estágio Supervisionado II do curso de Engenharia de Aquicultura Centro De Ciências Agrárias, Universidade Federal De Santa Catarina, 2013.

RIBEIRO, C; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, A.; MIRANDA, C. Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, p.63–70, 2007.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides asbiomaterials. **Polymer International**, v. 57, p. 397-430, 2008.

ROCHA, C. M. R.; SOUSA, A. M. M.; KIM, J. K.; MAGALHAES, A. J. M. C. S.; YARISHC, C.; GONCALVES, M. P. Characterization of agar from *Gracilaria tikvahiae* cultivated for nutrient bioextraction in open water farms. **Food Hydrocolloids**, 89, p. 260–271, 2019.

ROCHA, G. O.; FARIAS; G. M. **Filmes Compostos Biodegradáveis a Base de Amido de Mandioca e Proteína de Soja**. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural doRio de Janeiro – UFRRJ. CARVALHO, C. W. P., ASCHERI, J. L. R., GALDEANO, M. C. Embrapa Agroindústria de Alimentos, CTAA/Embrapa, Rio de Janeiro, RJ. **Polímeros**, vol. 24, n. 5, p. 587-595, 2014.

RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; ALENCAR, D. B.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 2, p.224-231, abr-jun, 2009.

ROONEY, M. L. Overview of active food packaging. **Active Food Packaging**. London: Blackie Academic & Professional. London, UK, p. 1-110. 1995.

RULON, J., ROBERT, H. Wetting of low-energy surfaces., In: J. Berg (Ed.), **Wettability**, Marcel Dekker Inc., p. 4–73, 1995.

SAKANAKA, L. S. **Estudo das condições de armazenamento sobre as propriedades mecânicas e de barreira de filmes de gelatina reticulada**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, p-175, 2002.

SALAME, M. Barrier polymers. In: BAKER, M. **The Wiley encyclopedia of packaging technology**. New York, USA: Wiley, p. 48-54, 1986.

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.

SANTACRUZ, S.; RIVADENEIRA C.; CASTRO, M. Edible films based on starch and chitosan. Effect of starch source and concentration, plasticizer, surfactant's hydrophobic tail and mechanical treatment. **Food Hydrocolloids**. v. 49, p. 89-94, 2015.

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, p. 267, 2002.

SELVALAKSHMI, S.; VIJAYA, N.; SELVASEKARAPANDIAN, S.; PREMALATHA, M. Biopolymer agar-agar doped with NH<sub>4</sub>SCN as solid polymer electrolyte for electrochemical cell application. **Journal of Applied Polymer Science**, 134, p. 15, 2017.

SHOKRI, S.; EHSANI,; JASOUR, M. S. Efficacy of Lactoperoxidase System-Whey Protein Coating on Shelf-life Extension of Rainbow Trout Fillets During Cold Storage (4 °C). **Food Bioprocess Technology**, 8: p. 54–62, 2015.

SILVA, R. X.; ABRANTES, M. R.; NASCIMENTO, J. P. A.; PINHEIRO, C. G. M. E.; FILGUERA, C. L. P.; SILVA, J. B. A. Qualidade higiênico-sanitária da tilápia (*Oreochromis ssp.*) fresca e congelada em mercados públicos. **Ciências Animal Brasileira**. v. 17, p. 574-580, 2016.

SILVA, P. M. **Atividade biológica de extratos de algas marinhas**, Dissertação (Instituto de Química de São Paulo – Título em Ciências Bioquímicas). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SIMMONDS, C. K; LAMPRECHT, E. C. South Africa fishng Industry research. **Institute Annual Report**, n. 34, p. 88 – 91. 1980.

SIRENO, M.; MÁRSICO, E. T.; FERREIRA, M. S.; MONTEIRO, GUERRA, M. L.; VITAL, H. C. JUNIOR, C. A. C.; MANO, S. B. Propriedades físico-químicas, sensoriais e bacteriológicas de camarões (*Litopenaeus brasiliensis*) irradiados e armazenados sob refrigeração. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 17, n. 2, p. 91-95, maio/ago., 2010

SIRACUSA, V.; ROCCULI, P.; ROMANI, S.; DALLA ROSA, M. Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 634-643, 2008.

SILVA, A. M. I. **Filmes e revetimentos comestíveis de quitosana e óleos essenciais na qualidade de camarão *Litopenaeus vannamei* congelado**. (Tese) doutorado. Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de pós-graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2018.

SILVA, D. S.; CANAFÍSTULA, V. C.; FERNANDES, F. P. Preparation and Characterization of membranes based on chitosan for topical drug delivery. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**. v. 6, p. 4436-4443, 2016.

SHIT S. C.; SHAH P. M. Edible polymers: Challenges and opportunities. **Journal of Polymers**, 427259/1– 427259/13, 2014.

SHUKLA, M. K.; SINGH, R. P.; REDDY, C.R.K.; JHA, B. Synthesis and characterization of agar-based silver nanoparticles and nanocomposite film with antibacterial applications. **Bioresource Technology**, 107, p. 295–300, 2012.

SMITH, A. L. – “Applied Infrared Spectra”, John Wiley & Sons, New York, 1979.

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. **Food Science and Technology**, v. 61, p. 524-531, 2015.

SOBRAL, P. J. A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre as suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p.1-14, 2000.

SOBRAL, P. J. A.; HABITANTE, A. M. Q. B. Phase transitions of pig skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, 15(4 e 6), p. 377-382, 2001.

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. **Food Science and Technology**, v. 57, p. 172-180, 2014.

SONG, B., SPRINGER, J. Determination of Interfacial Tension from the Profile of a Pendant Drop Using Computer-Aided Image Processing. **Journal of colloid and Interface Science**, v. 184, n. 1, p. 77–91, 1996.

SOROKA, W. **Fundamental of packaging technology**. Herndon : Institut of Packaging Professionals, 1995.

SOUSA, A. M. M.; MARTINS, S.; LAROTONDA, F. D. S.; HILLIOU, L.; GONÇALVES, M. P.; SERENO, A. M. **Matter Science**. Forum Vol. 587-588, p. 548-552, 2008.

SOUZA, A. M. M. **Aplicação de biopolímeros extraídos de algas na produção de embalagens biodegradáveis**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, 2008.

SOUZA, M. L. S. et al. Structural composition and anticoagulant activity of dermatan sulfate from the skin of the electric eel, *Electrophorus electricus* (L). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v.147, n. 03, p. 387-394, 2007.

SOUZA, A. C.; DITCHFIELD, C.; TADINI, C. C. Biodegradable films based on biopolymers for food industries. In M. L. Passos, & C. P. Ribeiro (Eds), **Innovation in Food Engineering: New techniques and products**, Boca Raton, FL: CRC Press, p. 511-537, 2010.

SOUZA, B., CERQUEIRA, M., BOURBON, A., PINHEIRO, A., MARTINS, J., TEXEIRA, J. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria biridiae*. **Food Hydrocolloids**, 27, p. 287–292, 2012.

STANSBY, M. E. Composition of Certain Species of Freshwater Fish. I. Introduction the determination of the variation of composition of fish. **Food Research**, v. 19, n. 2, p. 231-234, 1954.

SWANSON, K. M. J.; PETRAN, R. L.; HANLIN, J. H. **Culture Methods for Enumeration of Microorganisms**. In Compendium of methods for Microbiological Examination of foods. 4th ed. APHA: Washington-DC, cap. 6. p. 53 – 67, 2001.

TANADA-PALMU, P. S.; GROSSO, C. R. F. Effect of edible wheat gluten-based films and coatings on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. **Postharvest Biology and Technology**, v.36, p.199-208, 2005.

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.

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.

TSIRONI, T.; DERMESONLOUGLOUA, E.; GIANNAKOUROUA, M.; TAOUKIS, P. Shelf life modelling of frozen shrimp at variable temperature conditions. **Food Science and Technology**, London, v. 42, n. 2, p. 664-671, 2009.

URSI, S.; COSTA, L.; HAYASHI, R. T. L.; PEREIRA, E. J.; PAULA, PLASTINO, E. M. Intraspecific variation in *Gracilariabirdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): growth, and agar yield and quality of color strains under aquaculture. **Botany Marina**, 56, p. 241-248, 2013.

VALE, D. A. **FILMES E REVESTIMENTOS DO CARANGUEJO-UÇÁ (*Ucides cordatus*) COM APLICAÇÃO EM POSTAS DE SERRA (*Scomberomorus brasiliensis*) CONGELADAS**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal do Ceará, 2017.

VANHAECKE, L.; VERBEKE, W.; BRADANDER, H. F. Glazing of frozen fish: analytical and economic challenges. **Analytica Chimica Acta**, 672(1-2): p. 40-44, 2010.

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

VEJDAN, A., OJAGH, S. M., ADELI, A., & ABDOLLAHI, M. Effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the physico-mechanical and ultraviolet light barrier properties of fish gelatin/agar bilayer film. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, **Food Science and Technology**, 71, p. 88–95, 2016.

VEIGA-SANTOS P.; OLIVEIRA, L. M.; CEREDA, M. P.; ALVES, A. J.; SCAMPARINI, A. R. P.; Mechanical properties hydrophilicity and water activity of starch-gum films effect off additives and deacetylated xanthan gum. **Food hydrocolloids**. vol. 19. p 341-349, 2005.

VEIGA-SANTOS P.; DITCHFIELD C.; TADINI C. Development and Evaluation of a Novel pH Indicator Biodegradable Film Based on Cassava Starch. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 120, p. 1069-1079, 2011.

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.

VIEIRA, C. B. **Uso de moringa *Moringa oleifera* na redução de coliformes fecais em camarão sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri***. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

VIEIRA, R. H. S. F.; VIEIRA, G. H. F.; ROCHA, C. A. S.; SAKER, S. A.; SAMPAIO, A. H. Estudo organoléptico e bacteriológico de caudas de lagostas estocadas em gelo. **Arquivo de Ciências do Mar**, v. 25, n. 1 e 2, p. 63-75, 1986.

VILLANUEVA, R. D.; PAGBA, C. V.; MONTANO, N. E. Optimized agar extraction from *Gracilaria eucheumoides*. *Harvey*. **Botany Marina**, v. 40, n. 05, p. 369-372, 1997.

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, M. BI, J. Modification of characteristics of kefirin by changing the carbon source of *Lactobacillus kefirianofaciens*. **Journal Science Food Agriculture**. v.88, p.763–769, 2008.

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.

WILLIAMS, G.; POOL, R. Composites from natural fibers and soy oil resins. **Applied Composit Materials**. 7 (5-6): p. 421-432, 2000.

WU, Y.; GENG, F.; CHANG, P. R.; YU, J.; MA, X. Effect of agar on the microstructure and performance of potato starch film. **Carbohydrate Polymers**, 76, p. 299-304, 2009.

YOSHIMURA, C. Y. **Avaliação do potencial de cultivo e produção de ágar de *Gracilaria domingensis* e de *Gracilaria caudata* na Enseada de Armação do Itapocoroy** (Penha, Santa Catarina). 163 p. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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.

ZISMAN, W. A. Contact angle, wettability and adhesion. In: Fowlers, F.M. (Ed.), **Advances in Chemistry**, vol. 43. ACS, Whashington, DC, p.1-51, 1964.

ZHANG, C.; MADBOULY, S. A.; KESSLER, M. R. Biobased polyurethanes prepared from different vegetable oils. **Application Mater international**, 7, p. 1226-1233, Jan. 2015.

ZHANG, R.; WANG, W.; ZHANG, H.; DAI, Y.; DONG, H.; HOU, H. Effects of hydrophobic agents on the physicochemical properties of edible agar/maltodextrin films. **Food Hydrocolloids**, 88, p. 283–290, 2019.

ZHANG, Q.; QI, H.; ZHAO, T.; DESLANDES, E.; ISMAELI, N.; MOLLOYD, F. Chemical characteristics of a polysaccharide from *Porphyra capensis* (Rhodophyta). **Carbohydrate Research**, 340, p. 2447–2450, 2005.