



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

**DIEGO ALVES DO VALE**

**AÇÃO DOS REVESTIMENTOS EM MULTICAMADAS INTERCALADAS DE  
CARRAGENANA (*Hypnea musciformis*) E QUITOSANA (*Ucides cordatus*) NO  
SHELF LIFE EM FILÉS DE ATUM (*Thunnus albacares*) REFRIGERADO**

**FORTALEZA**

**2023**

DIEGO ALVES DO VALE

AÇÃO DOS REVESTIMENTOS EM MULTICAMADAS INTERCALADAS DE  
CARRAGENANA (*Hypnea musciformis*) E QUITOSANA (*Ucides cordatus*) NO  
SHELF LIFE EM FILÉS DE ATUM (*Thunnus albacares*) REFRIGERADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, como parte dos requisitos para 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

Coorientador(a): Prof.<sup>a</sup> Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

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

---

V243a Vale, Diego Alves do.

Ação dos revestimentos em multicamadas intercaladas de carragenana (*Hypnea musciformis*) e quitosana (*Ucides cordatus*) no shelf life em filés de atum (*Thunnus albacares*) refrigerado / Diego Alves do Vale. – 2023.

88 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2023.

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

Coorientação: Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes .

1. Revestimento em multicamadas. 2. Atividade antimicrobiana . 3. Atividade antioxidante.  
4. Atum. I. Título.

---

CDD 639.2

DIEGO ALVES DO VALE

AÇÃO DOS REVESTIMENTOS EM MULTICAMADAS INTERCALADAS DE  
CARRAGENANA (*Hypnea musciformis*) E QUITOSANA (*Ucides cordatus*) NO  
SHELF LIFE EM FILÉS DE ATUM (*Thunnus albacares*) REFRIGERADO

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

Aprovada em: 30/01/2023.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

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

---

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

---

Prof. Dr. Alvaro Marcos Pereira Lima  
Universidade Estadual do Rio Grande do Norte (UERN)

---

Dra. Lorena Alves Leite  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Primeiramente a Deus, Jesus e a espiritualidade por toda proteção, amor incondicional e conhecimento recebidos para seguir em frente nesta vida.

A todos os meus familiares que sempre acreditaram em mim e me apoiaram durante toda a minha jornada, meu irmão Tiago, tias; Rita, Maria Das Graças e Maria Goreth, meu afilhado Iago.

Dedico especialmente, minha mãe Maria das Dores, meu pai João de Deus, minha avó Benta e meu avô Augusto, que mesmo em outro plano espiritual sei que estão sempre me auxiliando.

Quero agradecer profa. Silvana Saker e Karolina Costa, pelo apoio e parceria no desenvolvimento desta pesquisa, além de toda sua amizade Karol sempre prestativa.

Agradecimento, ao meu orientador Professor Bartolomeu Warlene por todos esses anos de ajuda, projetos e pesquisas desenvolvimentos, amizade e compreensão. Como diz a espiritualidade, meu filho, Deus não erra, ele sabe quem deve estar no nosso caminho, e que Deus lhe abençoe Prof. Bartolomeu e sua família, obrigado pelo conhecimento e auxílio, continue sendo um ser humano bom, que não fecha as portas para ninguém e ajuda todos sem distinção.

Claudia Brandão, obrigado por toda ajuda nessa caminhada, auxílio desde o momento que cheguei ao LATEPE até o dia de hoje, que sua mãe Rita de Cássia e Alice seja sempre abençoada por Deus.

Jacqueline de Melo, obrigado por tudo, todos os dias que você me ajudou, deixando seu filho para eu conseguir finalizar esse projeto, Deus sabe os reencontros necessário na nossa vida, depois de muito tempo você veio para me auxiliar na finalização desse projeto.

Quero agradecer as alunas da Prof. Francisca Gleire Rodrigues, Vladila Oliveira, Rachel Soares e Larissa Nunes pelo auxílio na microbiologia.

Agradecimento a Prof. Francisca Gleire Rodrigues, pelo auxílio e aceitação da coorientação dessa pesquisa.

Agradecimento ao grupo Latepe, Claudia Cintia, Wilame, Ikaró Sousa e Davi Cerqueira.

Agradecimento ao Sidcleiton pelo incentivo e que tudo ia ser realizado, até quando foi necessário nos ajudou na lavagem das vidrarias, são nos pequenos detalhes que vemos a amizade.

“A vida sem ciência é uma espécie de morte.”

(Sócrates)

## RESUMO

O empenho na busca por uma nova técnica de revestimento comestível em alimento é uma estratégia pesquisada constantemente, com o intuito de melhorar a sua qualidade. A construção do revestimento em multicamada intercalada é um método que utilizar-se da atração eletrostática por meio do grupo funcional carregado com carga oposta, na qual apresentada pela carragenana e quitosana, o que viabiliza a utilização destes polímeros, além disso, agregação das diferentes propriedades antimicrobianas e antioxidantes dos revestimentos. O objetivo da presente pesquisa foi analisar a propriedade antimicrobiana e antioxidante, com diferentes concentrações de carragenana e quitosana, na elaboração de revestimentos em multicamadas intercaladas na conservação em filés de atum (*Thunnus albacares*) refrigerado  $1^{\circ}\text{C}\pm 0,3$  por meio de análises físico-químicas e microbiológicas. A análise antimicrobiana apresentou resultado positivo para a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus*, em ambos os polímeros de carragenana e quitosana. Na análise antioxidante, a quitosana apresentou diferença significativa ( $p < 0,5$ ) comparada com a carragenana dentro das formulações avaliadas, sendo mais eficiente para a capacidade de sequestro do radical (DDPH), poder quelação de íons ferrosos (FIC) e poder de redução de íons férricos (FRAP), entretanto, para o branqueamento com  $\beta$ -caroteno (BCP) a carragenana foi mais eficiente do que a quitosana. O revestimento em multicamada intercalada de 0,6% (m/v) apresentou diferença significativa ( $p < 0,5$ ) quando comparado a concentração 0,2% (m/v), para o nitrogênio bases voláteis totais (N-BVT), nitrogênio da trimetilamina (N-TMA), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT). As amostras revestidas com 0,6% (m/v) apresentaram as menores contagens de bactérias psicotróficas, além de um efeito bactericida ou bacteriostática para bactérias produtoras de histamina até quinto dia, com menores valores nas contagens subsequentes. O revestimento em multicamada intercaladas de 0,6% (m/v) pode ser utilizado para aumentar a vida de prateleira do atum refrigerado até décimo quinto dia, contudo, a concentração 0,2% (m/v) pode ser utilizada mesmo com uma qualidade inferior, visto que os valores estão dentro do permitido para a legislação brasileira.

**Palavras-chave:** revestimento em multicamadas; atividade antimicrobiana; atividade antioxidante; atum.



## ABSTRACT

The commitment to search for a new edible coating technique for food is a constantly researched strategy, with the aim of improving its quality. The construction of intercalated multilayer coatings is a method that uses the electrostatic attraction of oppositely charged functional groups, carrageenan and chitosan have these charges, which makes their use feasible, in addition, the different antimicrobial and antioxidant properties add the biological potential in coatings. The objective of the present research was to analyze the antimicrobial and antioxidant properties, with different concentrations of carrageenan and chitosan, in the elaboration of interspersed multilayer coatings of carrageenan and chitosan in the conservation of tuna fillets (*Thunnus albacares*) refrigerated at  $1^{\circ}\text{C}\pm 0.3$  through physical-chemical and microbiological analyzes. In the antioxidant analysis, chitosan showed a significant difference ( $p>0.5$ ) than carrageenan within the evaluated formulations, being more efficient for DPPH radical scavenging capacity, ferrous ions chelating activity (FIC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP), however, for  $\beta$ -carotene bleaching (BCP) carrageenan was more efficient than chitosan. The intercalated multilayer coating of 0.6% (m/v) showed a significant difference ( $p>0.5$ ) when compared to the 0.2% concentration (m/v), for nitrogen of total volatile bases (N-BVT), nitrogen of trimethylamine (N-TMA), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Samples coated with 0.6% (w/v) showed the lowest counts of psychrotrophic bacteria, in addition to a bactericidal or bacteriostatic effect for histamine-producing bacteria up to the fifth day, with lower values in subsequent counts. The 0.6% (m/v) interlayer multilayer coating can be used to increase the shelf life of refrigerated tuna up to the fifteenth day, however, the 0.2% (m/v) concentration can be used even with a lower quality, since the values are within the limits allowed by Brazilian legislation.

**Keywords:** multilayer coating; antimicrobial activity; antioxidante activity; tuna.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Fluxograma do processo de extração da carragenana.....	32
Figura 2	- Fluxograma do processo de extração da quitosana.....	33
Figura 3	- Contagem das bactérias produtoras de histamina.....	75

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	- pH em filé de atum refrigerado a $1\pm 0,3^{\circ}\text{C}$ para o tratamento grupo controle (sem revestimentos), revestimento em camadas de 0,2% carragenana e quitosana e revestimento em camadas 0,6% carragenana e quitosana.....	59
Gráfico 2	- Nitrogênio das bases voláteis totais em filé de atum refrigerado a $1\pm 0,3^{\circ}\text{C}$ para o tratamento grupo controle (sem revestimentos), revestimento em camadas de 0,2% carragenana e quitosana e revestimento em camadas 0,6% carragenana e quitosana.....	61
Gráfico 3	- Nitrogênio da trimetilamina em filé de atum refrigerado a $1\pm 0,3^{\circ}\text{C}$ para o tratamento grupo controle (sem revestimentos), revestimento em camadas de 0,2% carragenana e quitosana e revestimento em camadas 0,6% carragenana e quitosana.....	64
Gráfico 4	- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em filé de atum refrigerado a $1\pm 0,3^{\circ}\text{C}$ para o tratamento grupo controle (sem revestimentos), revestimento em camadas de 0,2% carragenana e quitosana e revestimento em camadas 0,6% carragenana e quitosana.....	67
Gráfico 5	Bactérias psicotróficas em filé de atum refrigerado a $1\pm 0,3^{\circ}\text{C}$ para o tratamento grupo controle (sem revestimentos), revestimento em camadas de 0,2% carragenana e quitosana e revestimento em camadas 0,6% carragenana e quitosana.....	69
Gráfico 6	- Bactérias produtora de histamina em filé de atum refrigerado a $1\pm 0,3^{\circ}\text{C}$ para o tratamento grupo controle (sem revestimentos), revestimento em camadas de 0,2% carragenana e quitosana e revestimento em camadas 0,6% carragenana e quitosana.....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Atividade antimicrobiana em poço para as soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana.....	46
Tabela 2	- Capacidade de sequestro do radical DPPH das soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana nas concentrações 0,2%, 0,4% e 0,6%.....	49
Tabela 3	- Poder de quelação de íons ferrosos (FIC) das soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana nas concentrações 0,2%, 0,4% e 0,6%.....	51
Tabela 4	- Poder de redução de íons férrico (FRAP) das soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana nas concentrações 0,2%, 0,4% e 0,6%.....	53
Tabela 5	- Atividade inibitória do branqueamento do $\beta$ -caroteno (BCB) das soluções eletrolíticas de quitosana e carragenana nas concentrações 0,2%, 0,4% e 0,6%. .....	55
Tabela 6	- Representa o custo de produção por camada do revestimento eletrolítico 0,2% e 0,6% de carragenana e 0,2% e 0,6% de quitosana.....	57

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	Objetivo geral.....	19
2.2	Objetivos específicos.....	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1	Polímeros.....	20
3.1.1	<i>Carragenana</i> .....	22
3.1.2	<i>Quitosana</i> .....	23
3.2	Revestimento camada por camada <i>Layer by Layer</i> .....	25
3.3	Qualidade do pescado.....	28
3.3.1	<i>Atum</i> .....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	Material biológico.....	32
4.1.1	<i>Obtenção da carragenana</i> .....	32
4.1.1.1	<i>Tratamentos das algas</i> .....	32
4.1.1.2	<i>Processo de extração</i> .....	32
4.1.2	<i>Obtenção da quitosana</i> .....	33
4.1.2.1	<i>Tratamentos dos resíduos e produção da farinha</i> .....	33
4.1.2.2	<i>Processo de extração</i> .....	33
4.2	Análise antimicrobiana dos revestimentos eletrolíticos.....	34
4.2.1	<i>Teste preliminar da pureza dos revestimentos eletrolíticos carragenana e quitosana</i> .....	34

4.2.2	<b>Bactérias-testes.....</b>	35
4.2.3	<b>Preparo e análise dos inóculos bacterianos.....</b>	35
4.3	<b>Análise antioxidantes.....</b>	36
4.3.1	<b>Capacidade do sequestro dos íons radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila).....</b>	36
4.3.2	<b>Capacidade quelante de íons ferrosos (FIC).....</b>	37
4.3.3	<b>Poder redutor dos íons férricos (FRAP).....</b>	37
4.3.4	<b>Atividade inibitória do branqueamento do <math>\beta</math>-caroteno (BCB).....</b>	38
4.4	<b>Critério de escolha e elaboração dos revestimentos em camada intercalada.....</b>	39
4.4.1	<b>Critério de escolha para aplicação dos revestimentos eletrolíticos em filés de atum.....</b>	39
4.4.2	<b>Os tratamentos para shelf life em filés de atum.....</b>	40
4.4.3	<b>Produção dos revestimentos eletrolíticos.....</b>	40
4.4.4	<b>Aplicação dos revestimentos eletrolíticos em multicamadas.....</b>	41
4.4.5	<b>Cálculo do preço dos revestimentos por kg de atum.....</b>	42
4.5	<b>Análise físico-químicas para o tempo de prateleira.....</b>	42
4.5.1	<b>pH.....</b>	42
4.5.2	<b>Determinação do nitrogênio das bases voláteis totais (N-BVT) .....</b>	42
4.5.3	<b>Determinação do nitrogênio da trimetilamina (N-TMA).....</b>	43
4.5.4	<b>Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....</b>	43
4.6	<b>Análises microbiológicas para o tempo de prateleira.....</b>	44
4.6.1	<b>Bactérias psicrotróficas.....</b>	44

4.6.2	<i>Bactérias produtoras de histamina</i> .....	45
4.7	Análise estatística.....	46
5	RESULTADOS.....	47
5.1	Determinação da atividade antimicrobiana das soluções eletrolíticas carragenana e quitosana in vitro.....	47
5.2	Determinação da atividade antioxidante das soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana in vitro.....	50
5.2.1	<i>Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)</i> .....	50
5.2.2	<i>Poder de quelação dos íons ferrosos (FIC)</i> .....	52
5.2.3	<i>Poder redutor dos íons férricos (FRAP)</i> .....	54
5.2.4	<i>Atividade inibitória do branqueamento do <math>\beta</math>-caroteno (BCB)</i> .....	55
5.3	Custo de produção por camada dos revestimentos eletrolíticos de carragenana e quitosana.....	57
5.4	Análises físico-químicas para o tempo de prateleira.....	59
5.4.1	<i>pH</i> .....	59
5.4.2	<i>Nitrogênio das bases voláteis totais</i> .....	62
5.4.3	<i>Nitrogênio trimetilamina</i> .....	64
5.4.4	<i>Substância ao ácido tiobarbitúrico</i> .....	67
5.5	Análise microbiológicas para o tempo de prateleira.....	70
5.5.1	<i>Bactérias psicotróficas</i> .....	70
5.5.2	<i>Bactérias produtoras de histamina</i> .....	72
6	CONCLUSÃO.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77

**APÊNDICE A – RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA  
(ANOVA) E TESTE DE TUKEY PARA COMPOSTOS PUROS DO  
CONTROLE POSITIVO PARA AS ATIVIDADES  
ANTIOXIDANTE.....**



## 1 INTRODUÇÃO

O acúmulo de resíduo pesqueiro vem crescendo a cada dia, sendo necessário uma medida de descarte adequado para que ocorra a preservação do meio ambiente, tendo a reutilização dos resíduos como uma forma de minimizar a poluição. A produção sustentável é um processo chave na redução da pressão sobre dos ecossistemas marinhos e uma forma de diminuir o impacto na produção de resíduos (ALFIO; MANZO; MICILLO, 2021). Nesse sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de novas pesquisas científicas com o reaproveitamento de resíduos pesqueiros, além da utilização dos bancos naturais como fonte de matéria-prima na produção de embalagens biodegradáveis.

Nesse sentido, houve crescimento em pesquisa científica voltado a utilização de polímero natural nos últimos anos, através dos resíduos pesqueiros na produção de revestimentos comestíveis. Os polímeros naturais são fontes de materiais para embalagens amplamente utilizados na indústria alimentícia para diversos fins, entre os quais servem como proteção aos danos físicos, químicos e degradação biológica dos alimentos, sendo bastantes empregados na produção de revestimentos comestíveis (GUPTA; BISWA; ROY, 2022).

As embalagens produzidas através dos polímeros naturais não são um substituto imediato para as embalagens plásticas convencionais utilizadas na proteção dos alimentos, entretanto, pode ser uma alternativa de pesquisa útil, para que ao longo prazo, possuam condições de substituir as embalagens de plásticos tradicionais (KUMAR *et al.* 2022). A grande dificuldade para o desenvolvimento de embalagem biodegradável é devido a sua propriedade, entre a qual está alta permeabilidade ao vapor de água e baixa resistência física da embalagem, o que acaba dificultando a sua aplicação como embalagem primária.

Atualmente, o revestimento produzido através do polímero natural funciona de forma secundária, no entanto, é necessário o desenvolvimento de pesquisa continua para que uma nova técnica de produção seja capaz de gerar uma embalagem primária a partir de polímero natural.

Em vista disso, uma alternativa para melhorar a aplicabilidade dos polímeros naturais nas indústrias de alimentos é através da combinação, mesmo como embalagem secundária. A combinação de polímero em revestimento de

multicamada intercalada é uma forma de utilizar uma propriedade antimicrobiana e/ou uma antioxidante característica de cada polímero, podendo auxiliar a deficiência de uma propriedade em que outro polímero venha advir, principalmente na diminuição do crescimento bacteriano ou da oxidação lipídica. Os revestimentos produzidos através de polissacarídeos, proteínas e lipídios se aplicados de forma isolada, sem combinações como um componente simples, podem ficar para trás em algumas propriedades, no entanto, as combinações de dois ou mais polímeros podem melhorar suas propriedades (BIZYMIS e TZIA, 2022).

Portanto, a combinação entre dois ou mais polímeros dos revestimentos em multicamadas aplicados em alimentos pode ser construída pela técnica de camada por camada, reproduzida a partir da técnica produzida em filme. Várias são as técnicas na produção de filmes camada por camada, com diferentes tecnologias de montagem que incluem: imersão, desumidificação, rolagem a rolo, centrifugação, saturação calculada, imobilização, fiação, alta gravidade, atomização, eletrodeposição, montagem magnética, eletrocalagem, filtragem, microfluídica e spray (RICHARSON *et al.* 2015).

A técnica de spray é de fácil aplicação para os revestimentos em multicamadas intercalados em alimentos, porém existem outros aspectos a serem analisados, entre os quais estão a compatibilização entre os polímeros, além disso, a adesão entre as camadas, visto que a técnica camada por camada se utiliza da atração eletrostática entre os polímeros, mais precisamente através das ligações químicas, entre um grupo funcional carregado positivamente ao grupo funcional carregado negativamente. Logo, os polímeros precisam conter grupos funcionais que propiciem tais ligações químicas, o que é possível observar na quitosana, por apresentar um grupo amino ( $\text{NH}_3^+$ ) que pode ser carregado positivamente, enquanto a carragenana apresenta um grupo sulfato ( $\text{OSO}_2^-$ ) que pode ser carregado negativamente, assim, os dois polímeros são adequados na formulação dos revestimentos em multicamadas intercalados.

A carragenana e quitosana são polímeros de fáceis aquisições, podendo ser explorada na elaboração de revestimento, sendo a carragenana encontrada em bancos naturais de algas marinhas e a quitosana extraída de resíduos de crustáceo. A carragenana é um polissacarídeo natural obtido a partir de algas vermelhas comestíveis, sendo um poligalactano sulfatado (SOUZA *et al.* 2018a), tendo grande aplicação na indústria de alimentos devido as suas

características de biocompatibilidade, biodegradabilidade, ausência de toxicidade e resistência mecânica (ALBUQUERQUE *et al.* 2016).

Já a quitosana é um polímero natural obtido através da desacetilação da quitina, sendo polissacarídeo policatiónico solúvel em um ambiente ácido com um pKa em torno de 6,5 (DEMIR *et al.* 2016). Entre os hidrocolóides disponíveis a quitosana é um dos polímeros com maior potencial para o desenvolvimento de revestimento comestível (CARDOSO *et al.* 2016).

Nesse contexto, a quitosana e carragenana são polímeros normalmente empregados na produção de revestimentos comestíveis, o que facilita a produção do revestimento em multicamada intercalada, principalmente devido a propriedade antimicrobiana e antioxidante na preservação dos alimentícios perecíveis, amplamente relatado na literatura (JIANG *et al.* 2021; KUSNADI *et al.* 2021; VALE *et al.* 2020).

O pescado é produto perecível rico em proteína e gordura poli-insaturadas. Segundo Rathod *et al.* (2023), os peixes são amplamente conhecidos por seus diversos perfis nutricionais, incluindo água (70–84%), proteínas (15–24%), gordura (0,1 a 22%) e minerais, cálcio e fósforo, bem como vitaminas A, D, B e C (1–2%). No entanto, devido ao seu alto teor de umidade e proteína e presença de ácido poli-insaturado altamente oxidáveis, o peixe é extremamente perecível e suscetível a diferentes tipos de degradação bioquímica, física e microbiológica em toda a sua cadeia produtiva (RATHOD *et al.* 2023). Entre os pescados capturados, o *Thunnus albacares* é a segunda espécie mais importantes em águas oceânicas em todo o mundo, representando 24% das capturas totais, segundo dado a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura em 2019 (SÁNCHEZ-PARRA *et al.* 2022). O que reforça a importância no desenvolvimento de tecnologia para a conservação deste pescado.

Por esta razão, o revestimento multicamada intercalada é uma fonte de pesquisa relevante na conservação do *Thunnus albacares*. Logo, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a ação antimicrobiana e antioxidante dos revestimentos em multicamadas intercaladas de carragenana (*Hypnea musciformis*) e quitosana (*Ucides cordatus*) no *shelf life* em filés de atum (*Thunnus albacares*) refrigerado a  $1^{\circ}\text{C}\pm 0,3$  por 20 dias.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Ação dos revestimentos em multicamadas intercaladas de carragenana (*Hypnea musciformis*) e quitosana (*Ucides cordatus*) na avaliação do *shelf life* em filés de atum refrigerado a 1°C (*Thunnus albacares*) por 20 dias.

### 2.2 Objetivos específicos

- Extrair carragenana (*Hypnea musciformis*) e quitosana (*Ucides cordatus*);
- Verificar as atividades antimicrobianas das soluções de eletrolíticas em cepas padrão de bactérias;
- Verificar as atividades antioxidantes das soluções de eletrolíticas;
- Avaliar a proteção dos revestimentos em multicamadas intercalados na degradação proteica do músculo do atum;
- Avaliar da proteção dos revestimentos em multicamadas intercalados na degradação lipídica do músculo do atum;
  - Avaliar da proteção dos revestimentos em multicamadas intercalados para bactérias produtoras de histamina no músculo do atum;
- Calcular o custo de produção dos revestimentos em multicamadas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Polímeros

O polímero é uma macromolécula formada a partir de unidade conhecida como monômero, sendo observado repetição ao longo da cadeia unido por uma ligação covalente, formado um polímero de alto peso molecular. Warson (2001) relata que o polímero é formado por unidade básica (simples) conhecida como mero, por meio da polimerização, ocorrendo a ligação entre unidade repetida na formação do polímero. Os polímeros podem ser classificados de acordo com a sua origem; os materiais extraídos de fontes naturais, como a celulose, amido, quitina, quitosana são conhecidos como os biodegradáveis, enquanto os que apresentam monômeros de origem do petróleo ou sintetizados em laboratórios são conhecidos como sintéticos (SIMAN FILHO e SANFELICE, 2018).

Os polímeros sintéticos são classificados como plásticos, borrachas e fibras; alguns exemplos destes polímeros são polipropileno, polietileno, policloreto de etila, polietileno tereftalato e poliestireno que representam cerca de 96% do consumo pelos brasileiros (MARTINHON *et al.* 2019). Os autores ainda reforçam que os plásticos estão difundidos na rotina dos brasileiros, possuindo inúmeras finalidades. Na indústria alimentícia para a proteção dos alimentos, o polietileno é a principal fonte de matéria-prima na confecção das embalagens.

A embalagem de polietileno, segundo Silva *et al.* (2020) é barata e simples, sendo o tipo mais comum dos plásticos. Portanto, este material gera um interesse para o acondicionamento dos alimentos, além de facilitar o transporte e garante que o produto não entre em contato com bactérias e fungos, mantendo a segurança alimentar para o consumidor. Contudo, a utilização desta embalagem vem gerando uma preocupação no ponto de vista ambiental, pois o tempo necessário para se decompor é longo, uma vez que, os microrganismos não conseguem utilizar os plásticos com fonte de alimento. Siman Filho e Sanfelice (2018) relatam que poucos são os grupos funcionais que podem ser degradados por bactérias e fungos, além disso, a natureza apolar dos polímeros impede a solubilidade em água.

Os polímeros trazem essa contradição, pois a indústria não consegue manter-se sem os plásticos, mas existe uma preocupação com o descarte inadequado no meio ambiente e nos oceanos, sendo agravado por uma vida curta

nas mãos dos consumidores, o que intensifica o acúmulo no meio ambiente, portanto, uma política voltada para a minimização da poluição deve ser adotada, visto que o Brasil é o quarto maior produtor de plástico no mundo (CONCEIÇÃO *et al.* 2019).

Diante do exposto, é essencial uma medida para amenizar a poluição do meio ambiente por embalagens plásticas, havendo a necessidade da substituição de embalagem sintética por biodegradável, isso só será possível, mediante de pesquisa com os polímeros naturais, para que a construção do conhecimento gere informação capaz de produzir uma embalagem biodegradável. Azevedo *et al.* (2017) enfatizam o interesse por produtos biodegradáveis, visando novas políticas para o desenvolvimento sustentável, além conscientização por parte da população na preservação do meio ambiente.

Nesse contexto, os polímeros naturais são um caminho para o desenvolvimento de embalagens sustentáveis. A diversidade de polímeros naturais como os polissacarídeos e proteínas são encontrados em vegetais e animais, no ambiente marinho e meio ambiente (BALAJI *et al.* 2018). Sendo assim, o desenvolvimento de embalagem biodegradável pode ser intermediado pelo conhecimento adquirido na produção de revestimento comestível. Nos últimos anos, vem crescendo a quantidade de pesquisa com os revestimentos comestíveis à base de biopolímeros e substâncias bioativas naturais (YONG e LIU, 2021).

Contudo, apesar dos esforços na substituição do polímero sintético para o biodegradável, verifica-se que o biopolímero e/ou o polímero natural, ainda possui limitação para seu uso, devido ao alto custo no processo de produção, baixa produtividade, características frágeis e barreira de proteção inferior (DEY *et al.* 2021). Essas características são ligadas ao carácter hidrofílico dos polímeros naturais. Entretanto, o revestimento produzido através do polímero natural é o um novo caminho para o entendimento na construção de embalagem biodegradável.

Atualmente, os revestimentos de polímeros naturais funcionam como embalagens secundárias como já mencionados anteriormente, mas podem proporcionar atividades que inibir o crescimento de bactérias e proporcionem atividade antioxidante que não encontradas nos polímeros sintéticos.

Entre os polímeros naturais, a quitosana vem evidenciado característica relevante na proteção da degradação de alimento com seu potencial antimicrobiano capaz de aumentar qualidade do produto durante a estocagem, entre os quais estão

as carnes, ovos ou peixes (SILVA *et al.* 2019, YANG *et al.* 2019a, JAYAWARDANA e AFANDI 2019). A carragenana é outro polímero natural encontrada em algas marinhas, que vem sendo bastante estudada como revestimentos comestíveis nos alimentos (PERERA *et al.* 2021 e SEDAYU, CRAN, BIGGER, 2019).

### **3.1.1 Carragenana**

A carragenana é um dissacarídeo que consiste em ligação alternada de  $\alpha$ -(1-3)-D-galactose e  $\beta$ -(1-4)-3,6-anidro-galactose-d ou L-galactose. A carragenana é um poligalactano sulfatado de alto peso molecular encontrado em várias espécies de algas vermelhas da classe Rhodophyta, sendo um polímero linear composto por cadeia de açúcares de galactoses repetidos, diferindo na quantidade de grupo sulfato (MCKIM *et al.* 2018). O grupo sulfato presente na molécula pode variar de 15-40%, além de ser um polímero com peso molecular variando entre 100 a 1000 KDa (SEDUYA *et al.* 2019). A posição do grupo sulfato na configuração da molécula é de fundamental importância para a determinação do tipo de carragenana encontrado entre as diferentes espécies de algas.

A carragenana comercializada geralmente é classificada em três tipos kappa ( $\kappa$ ), iota ( $\iota$ ) e lambda ( $\lambda$ ), dependendo do número de grupo sulfato no resíduo 3,6-anidro-D ou galactose, como também de sua distribuição (ROY e RHIM, 2019). Segundo Ruitter e Rudolph (1997), os tipos  $\kappa$ ,  $\iota$  e  $\lambda$  carragenana possui um, dois ou três grupo sulfato, respectivamente, apresentando percentual 20% ( $\kappa$ ), 33% ( $\iota$ ) e 41% ( $\lambda$ ) (m/m). Entre os três tipos, a espécie do tipo kappa é a de maior relevância para as indústrias.

A *Hypnea musciformis* é uma alga pertencente a classe das rodofíceas, rica em carragenana do tipo kappa, sendo uma das mais utilizadas pela indústria e de fácil aquisição por meio dos bancos naturais encontrada no litoral cearense. A *Hypnea musciformis* é a espécie mais conhecida do gênero *Hypnea*, sendo relatada em muitas praias tropicais e subtropicais (RAMLOV *et al.* 2019). O gênero *Hypnea* é uma importante fonte de ficocolóides, especialmente do tipo kappa carragenana, sendo explorado comercialmente em todo o mundo, não sendo diferente no Brasil, pois é um gênero de alto valor econômico no setor marinha (MARINHO-SORIANO, 2017).

Atualmente, *Hypnea musciformis* tem uma técnica de produção bem desenvolvida, no próprio Estado do Ceará, apresentando um cultivo bem

estabelecido na praia de Flecheiras, localizada na cidade de Trairi, além dos bancos naturais no litoral cearense. Pereira (2019), reporta que o cultivo da *Hypnea musciformis* na cidade de Flecheiras é bem consolidado para os grandes e médios produtores, entretanto, os custos de produção da carragenana ainda inviabilizam a comercialização advinda do cultivo. Portanto, os bancos naturais são as melhores fontes para a produção da carragenana com o intuito de reduzir o custo de produção. Quanto menor o custo de produção maior será a viabilidade econômica dos revestimentos comestíveis de carragenana.

A carragenana é boa opção na produção de revestimentos comestíveis, pois é solúvel em água, entretanto, sua solubilidade é afetada pelo grupo sulfato presente na molécula, logo, o maior teor de sulfato gera a necessidade de uma maior temperatura para proporcionar uma solubilidade mais homogênea (TAVASSOLI-KAFRANI *et al.* 2016), o que não é problema para o tipo kappa, devido apresentar só um grupo sulfato. Além disso, Segundo Zheng *et al.* (2019a), em solução aquosa, os tipos  $\kappa$  e  $\iota$  carragenana formam gel forte e macio, sendo um ponto positivo na produção de revestimentos comestíveis, além de promover uma melhor solubilidade do polímero na produção dos revestimentos.

O revestimento de carragenana é uma boa opção para o retardamento da degradação de alimentos. Segundo Jayakody *et al.* (2022), o revestimento de carragenana é uma boa técnica para analisar a redução de produtos químicos como nitrogênio das bases voláteis totais, peróxidos e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, cujo mesmo são indicadores de qualidade, portanto, uma menor quantificação durante o armazenamento aumenta a qualidade do alimento. Diante disso, os revestimentos de carragenana é uma boa escolha na aplicação em pescado.

### **3.1.2 Quitosana**

A quitosana é um polímero catiónico constituído por ligação entre unidade de monômero repetido, sendo observado o 2-acetomida-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosose e o 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosose, entretanto, a unidade do monômero 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosose deve ser superior a 50% (FARIAS *et al.* 2019). A unidade do 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosose é predominante para a estrutura molecular da quitosana, uma vez que, no processo de desacetilação há remoção do



grupo acetil e a permanência do grupo amino, sendo esse grupo de fundamental importância para a propriedade físico-química da molécula.

A propriedade físico-química da quitosana é desempenhada em função dos três grupos funcionais presentes (primário - OH, secundário - OH e - NH<sub>2</sub>), tais grupos favorecem a solubilidade em água (DUAN *et al.* 2019). Os autores ainda reforçam a importância do grupo amino, visto que a solubilidade da quitosana prevalece em meio ácido, sendo necessário um pH ácido para a ocorrência da protonação do grupo amino, o que permite a solubilidade do polímero. Todavia, quando o pH se encontra acima de 6, ocorre a desprotonação do grupo amino, não sendo observado a solubilidade deste polímero. Entre os três grupos funcionais da molécula, o grupo amino é o mais importante, pois um elevado grau de desacetilação consiste em maior proporção do grupo amino, o que possibilita uma maior reatividade química da quitosana. A presença do grupo amino melhora as propriedades químicas, físicas e biológicas da quitosana (PRIYADARSHI e RHIM, 2020).

Portanto, para obtenção de uma quitosana de qualidade é importante controlar o processo de extração, para uma maior qualidade da propriedade físico-química do polímero. Os resíduos da carapaça do caranguejo e camarão são as principais fontes de biomassa na produção industrial da quitosana através da quitina presente na carapaça, o que possibilita a reutilização dos resíduos a partir dos frutos do mar (BAKSHI *et al.* 2020). A extração da quitina pode ser realizada por meio de um método químico ou enzimático. Normalmente, a quitina industrial é produzida por meio de um método químico, com a utilização de ácido e base. A extração da quitina em crustáceo ocorre em três etapas: a primeira por meio da desmineralização com a remoção do carbonato de cálcio através do ácido clorídrico; seguida da desproteínização com a remoção da proteína com auxílio do hidróxido de sódio e por último a despigmentação com o uso de hipoclorito de sódio (VALE *et al.* 2020).

A quitina é um polissacarídeo branco que desempenha uma função estrutural, facilmente encontrada em muitos organismos vivos, entretanto, para uma maior aplicação deste polímero na indústria, uma desacetilação parcial em condições alcalinas ou uma hidrólise enzimática deve ser realizada na produção da quitosana, visto que este polímero tem uma grande potencialidade biotecnológica (MOHEBBI *et al.* 2019). O processo de desacetilação é uma etapa importante na produção da quitosana, sendo necessário uma padronização com alta temperatura e

pH alcalino, por isso, o teor do hidróxido de sódio recomendado é de 40-50%, além disso, uma temperatura em torno de 100°C para resultar em uma quitosana de qualidade.

A quitosana é um polímero de origem natural que possui múltiplas aplicações, na produção de filmes biodegradáveis, revestimentos comestíveis, nanocompósitos e entre outros, o que desperta o interesse da comunidade científica, além de vários setores das indústrias, particularmente a de alimentos (KUMAR *et al.* 2019). Contudo, é necessário certificar o uso de uma quitosana de qualidade para que os revestimentos sejam capazes de auxiliar na preservação dos alimentos. Devido a atividade antimicrobiana, a quitosana tem sido considerada uma alternativa adequada como fonte de conservante de alimentos ou material de revestimento para substituir os polímeros não biodegradáveis e/ou não renováveis, além disso, sendo um competente capaz de reduzir substância nociva aplicada nos alimentos (MUJATA *et al.* 2019).

### **3.2 Revestimento camada por camada (*Layer by Layer*)**

Nas últimas décadas, uma nova tecnologia na montagem de filme em multicamada vem atraindo o interesse por parte da comunidade científica na fabricação em sistemas hierárquicos com uma ampla aplicação em várias linhas de pesquisas (LI *et al.* 2020). Decher *et al.* (1992) foram pioneiros e propuseram que as soluções eletrolíticas com cargas opostas poderiam ser uma alternativa na formulação de filme em multicamada intercalada. Diante do exposto, os polímeros precisam ser capazes de se ionizar em duas soluções distintas, uma solução aniônica e uma outra catiônica, sendo imprescindível para que ocorra as ligações químicas entre as camadas intercaladas uma sobre a outra.

Os filmes em multicamadas são constituídos por dois ou mais polímeros, para que se estabeleça uma interação eletrostática entre cada camada, desta forma, cada polímero ao dissolver-se em solução aquosa precisa possuir condições química de reajuste do pKa com diferente potencial, visto a necessidade da atração entre as camadas para que se promova aderência. A montagem camada por camada aproveita as forças naturais (por exemplo, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, coordenação metal-orgânica, interação de transferência de carga e interações moleculares) para haver aderência entre as camadas, o que requer menos investimento em infraestrutura de fabricação e energia do que outras

técnicas (LIPTON *et al.* 2020). Diante disso, a técnica camada por camada tem sido aplicada em várias áreas, especialmente devido a facilidade e eficácia, pois a moldagem eletrostática entre os polímeros é uma forma mais atrativa para aplicação do método (FU *et al.* 2019). Atualmente, vários são os estudos com polímeros naturais com filme em camada por camada, desse modo, essa tecnologia pode ser usada para revestimentos em multicamadas intercaladas.

O revestimento é uma técnica já bem consolidada na aplicação em alimentos com intuito de estender o tempo de prateleira, sendo produzido a partir de polímero natural com finalidade de proporcionar um poder bacteriostático ou bactericida, pois as bactérias são as principais fontes de deterioração do pescado, logo, minimizar o crescimento desse micro-organismo é uma maneira de melhorar qualidade nutricional deste alimento. O poder antimicrobiano do revestimento produzido a partir de polímero natural já é bem descrito na literatura (BAPTISTA *et al.* 2020; KHOJH *et al.* 2020; KULAWIK *et al.* 2019). Ao optar por revestir o pescado ao invés de adicionar um filme sobre o mesmo, é uma forma de garantir que toda a superfície do alimento seja coberta sem ocorrer nenhuma falha, pois normalmente os filmes têm um caráter hidrofílico, enquanto o pescado apresentar uma superfície com elevado teor de água, isso torna os filmes quebradiços, sendo a melhor opção revestir o pescado.

O revestimento em multicamadas (*Layer by Layer*) parte do princípio observado em filme, utilizando dois ou mais polímeros por meio de camadas alternadas, essa intercalação de polímeros é uma vantagem quando comparado ao revestimento convencional, visto que o convencional é realizado apenas com um polímero, enquanto as combinações em multicamadas é uma estratégia mais atrativa, devido as combinações de diferentes propriedades, protegendo o alimento com mais eficiência. Nos últimos anos, os revestimentos em multicamadas em alimentos ganharam interesse significativos, devido a versatilidade, funcionalidade e conveniência, já que as multicamadas combinadas trazem os benefícios de cada camada em termos de barreira, integridade e propriedades funcionais (Anukiruthika *et al.* 2020). Atualmente, existe uma variedade de polímero natural que pode ser utilizado na construção em camadas, para o aproveitando a particularidade funcional de cada polímero. Alguns polímeros apresentam uma maior atividade antimicrobiana com amplo espectro de ação, enquanto outro polímero apresente maior ação antioxidante.

Desta maneira, a construção camada por camada traz uma vantagem na sua aplicação, pois possibilita que as combinações de materiais distintos sem perder suas propriedades, outro fator importante, é em relação ao controle da arquitetura, que permite uma melhor exploração do contato entre os componentes, além disso, a quantidade de material requerida para produção dos revestimentos serem menores (OLIVEIRA *et al.* 2019). A construção de camada por camada ainda é uma técnica pouco explorada em alimentos, sendo um novo campo para realização de novos estudos. Portanto, a necessidade no desenvolvimento da tecnologia em revestimentos comestíveis através de multicamadas intercaladas é uma alternativa para melhorar o potencial de aplicação em alimentos.

O revestimento em multicamada é uma proposta de pesquisa mais completa para aumentar o tempo de prateleira do pescado. Deste modo, para a produção do revestimento em multicamada é imperdível a escolha do polímero na formulação da solução, sendo o critério de escolha um fator primário, pois o polímero deve conter grupo funcional que possibilite a elaboração da solução eletrolítica em diferente pH. Tanto a carragenana com o grupo éster sulfato ( $^{-}\text{OSO}$ ) como a quitosana com grupo amino ( $\text{NH}_3^+$ ) apresentam tais características, tornando viável a produção dos revestimentos em multicamadas. É sabido que os parâmetros físico-químicos das soluções eletrolíticas são fortemente influenciados pelo pH, força iônica, temperatura e solvente, além disso, a concentração do eletrólito, peso molecular e densidade da carga, tendo papéis importantes na construção do revestimento camada por camada (ZENG e MATSUSAKI, 2019).

Em vista disso, o pH é uma variável importante na construção dos revestimentos em multicamadas, dessa forma, esse parâmetro é critério fundamental na escolha do polímero. A quitosana tem a necessidade de um pH ácido para dissolve-se, o que favorece a construção do revestimento em multicamada, sendo uma solução catiônica, além disso, a quitosana possui propriedade antimicrobiana e antioxidante únicas que vão agregar na proteção do alimento em conjunto com mais um polímero. A carragenana é polímero com propriedade antimicrobiana e antioxidante, no entanto, já com potencial de formar uma solução eletrolítica aniônica, possibilitando a construção do revestimento em multicamada com a quitosana. Cada camada pode ter uma característica única na preservação do

alimento, tendo a combinação a possibilidade de melhorar a forma de aplicação em alimentos.

A aplicação dos revestimentos em multicamadas intercaladas (LBL) pode ser empregue por meio da imersão do substrato em soluções alternadas de cargas opostas ou por pulverização, ambos os métodos têm potenciais tecnológicos com alto rendimento, sendo a carga elétrica alterada pelo pH, para interação entre as ligações químicas dos polímeros (KUMAR *et al.* 2020). No entanto, entre as duas técnicas possíveis de aplicações, a pulverização é uma forma mais econômica a respeito da quantidade de revestimento gasto, sendo a forma mais viável para implementação nas indústrias alimentícias, pois esta técnica evita o desperdício ao revestir o alimento, controlando a quantidade a ser aplicada.

### **3.3 Qualidade do pescado**

A segurança alimentar é uma forma de garantir ao consumidor um produto de qualidade capaz de oferecer os nutrientes adequados, mas para isto, é necessário tomar decisões e abordar técnicas adequadas para manutenção na conservação dos alimentos. O pescado é uma fonte de proteína, no entanto, apresenta uma maior perecibilidade quando comparado com outras fontes; a bovina e o frango, logo, as tomadas de decisões para garantir a qualidade são primordiais sem causar malefícios a saúde do consumidor.

Do ponto de vista nutricional, o pescado é um produto perecível devido a quatro fatores: deterioração autolítica (enzimas do próprio pescado, que após a morte favorece a degradação), oxidativa, pois apresenta uma quantidade elevada de gordura, o teor elevado de água que prevalece o desenvolvimento de micro-organismos (bactérias) e pH próximo da neutralidade (DANTAS FILHO *et al.* 2020). Vieira (2003) reporta que bactérias são mais proteolíticas que sacarolíticas, significando dizer que crescem mais rapidamente em meios que contêm proteínas, peptídeos e aminoácidos como principais fontes de carbono, do que em meios com polissacarídeos ou açúcares simples.

Portanto, o gerenciamento na conservação do pescado deve ser adotado durante toda a cadeia produtiva, desde a captura até a sua comercialização, para garantir um produto de qualidade ao consumidor. A cadeia do frio é uma prática bastante aplicada na manutenção da qualidade do pescado, sendo normalmente empregada a refrigeração ou congelamento, contudo, o emprego do frio retarda o

processo de degradação, mas o crescimento do microrganismo ao longo do armazenamento persiste, assim sendo, o pescado ainda sofre com processo de deterioração. O pescado fresco deve ser resfriado o mais rápido possível, e o tempo entre a captura e o resfriamento deve ser limitado no máximo de 3 horas, mantido em gelo (DUARTE *et al.* 2020), esta técnica reduz o processo de degradação e mantém a qualidade do pescado. Diante disto, a refrigeração reduz a degradação do pescado, mas também o revestimento comestível pode agregar proteção contra a degradação química e microbiológica em pescado refrigerado.

O revestimento de quitosana é capaz de aumentar o tempo de prateleira em pescado, já sendo bem relatada na literatura (REZAABAD *et al.* 2017; SOARES *et al.* 2017 e YU *et al.* 2017), no qual apresenta propriedade antimicrobiana, melhorando as propriedades físico-químicas do pescado durante o armazenamento. A relação entre a atividade antimicrobiana e as propriedades físico-químicas estão correlacionadas com a degradação das proteínas por bactérias, que acabam formando compostos como: amônia, trimetilamina, putrescina e cadaverina, quantificados por bases nitrogenadas voláteis, o aumento das bases nitrogenadas diminuem a qualidade do pescado durante a estocagem.

Além da manutenção da qualidade proteica, os revestimentos precisam preservar os lipídeos presentes do músculo do pescado. Vale *et al.* (2020) observaram que o revestimento de quitosana produzido do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) é capaz de melhorar a qualidade na degradação proteica em filés *Scomberomorus brasiliensis* e redução da oxidação lipídica no combate aos radicais livres.

Novas fontes de polímeros na produção de revestimento em pescado devem ser testadas, principalmente com o potencial antioxidante, como é o caso da carragenana, podendo ser auxiliada através da combinação com outros polímeros. Várias são as pesquisas em relação à carragenana como potencial de embalagem e indicativo de frescor em alimentos (CHI *et al.* 2020; FARHANA e HANI 2017; SEDUAY *et al.* 2018 e LIU *et al.* 2018). A carragenana é um polímero com ação antimicrobiana para a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, embora não relatada para as bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enterica* (Souza *et al.* 2018b). Além disso, Bin *et al.* (2018) confirmam uma boa capacidade antioxidante da carragenana em teste *in vitro*.

Nesse contexto, o pescado marinho é rico em gordura poli-insaturado. Logo, uma combinação entre polímero distinto em relação a atividade antioxidante é forma interessante na conservação do pescado. O revestimento em multicamada intercalada é uma proposta viável, cujo cada camada pode agir de acordo com o potencial do polímero, tendo a carragenana a função de proteger contra a degradação lipídica, enquanto a quitosana pode auxiliar nesta função, visto que cada polímero pode contribuir de forma diferente, tornando aplicação do revestimento no pescado mais adequado.

### **3.3.1 Atum**

O atum pertence à família Scombridae, composta por oito espécies: *Katsuwonnus pelamis*, *Thunnus alalunga*, *T. albacares*, *T. altanticus*, *T. obesus*, *T. maccoyii*, *T. thynnus*, *T. tongol*, reconhecidas pelo Ministério da Agricultura do Brasil em 2010 (GONÇALVES, 2021), com grande destaque na comercialização, possuindo alto valor de mercado devido ao seu perfil nutricional (ABDULLAH *et al.* 2020). A pesca do atum vem crescendo no Estado do Ceará, sendo representativa no cenário nacional. O *Thunnus albacares* é uma das espécies reconhecidas como atum e afins, tendo importante destaque na capturada em 2016 no Estado do Ceará, representando 95% do total de 509,3 toneladas (FREITAS, 2018), enquanto a nível mundial foi de 1.462.540 toneladas (FAO, 2018).

A espécie albacora (*Thunnus albacares*) é epipelágica, habitando regiões com temperatura entre 18 a 31°C, em profundidade de até 100 metros (COLLETE e NAUEN, 1983). A espécie tem elevado valor comercial, sendo comercializada na forma processada como enlatado, sashimi ou filé. Entre as diferentes espécies de atum, as mais utilizadas na indústria de enlatados são *Thunnus albacares*, *Thunnus obesus* e *Katsuwonus pelamis* (BOJGHATTA *et al.*, 2019). A diversidade de produto e valor comercial é por conta da gordura de alta qualidade presente no músculo do atum.

Os peixes marinhos como os atuns são ricos em ácidos graxos poli-insaturados essenciais devido a sua alimentação a base de fitoplâncton. Os ácidos graxos (AG) poli-insaturados são quimicamente classificados como de cadeias longas por conterem 14 a 22 átomos de carbonos (SANTOS *et al.* 2018), apresentando mais de duas ligações duplas. Os peixes marinhos são ricos especificamente em dois tipos de ácidos graxos poli-insaturados, o ácido

docosahexanenoico (DHA) e eicosapentaenoico (EPA). Quando analisou o perfil de ácidos graxos no atum albacora, observou-se uma maior proporção de DHA (22-36%) do que EPA (3,3-4,2%) comparando em três partes distintas dos músculos, entre as quais estavam o dorso, o ventre e carne mais escuro (SAITO 1996).

O atum é fonte de DHA e EPA que são essenciais na alimentação humana, o DHA é importante para o cérebro, principalmente no funcionamento dos neurônios, o EPA tem função anti-inflamatória, prevenindo doença vascular e circulatória. Embora o ácido linolênico (18:3  $\omega$ -3) possa ser convertido, em EPA e DHA, as taxas de conversão são baixas, uma vez que o ácido linoléico (18:2  $\omega$ -6), precursor do ácido araquidônico (AA) prevalece na dieta ocidental (Gonçalves 2021), por isso é necessário ingeri-los através da alimentação. O atum é importante fonte ômega 3, entretanto, a gordura poli-insaturada é de fácil oxidação, sendo necessária medida de preservação do pescado.

O pescado refrigerado sofre processo de oxidação, ocorrendo alterações hidrolíticas e auto-oxidativas, desencadeado pelo desenvolvimento da rancificação (*off-flavor*) (TENYANG *et al.* 2019). Portanto, como já mencionado, a carragenana e quitosana em conjunto podem auxiliar na redução da oxidação no pescado refrigerado, sendo uma alternativa na produção dos revestimentos em multicamadas intercaladas.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material Biológico

Os polímeros carragenana (*Hypnea musciformis*) e quitosana (*Ucides cordatus*) para a produção dos revestimentos em multicamadas intercaladas foram produzidos no Laboratório de Tecnologia do Pescado no Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará. As espécies foram registradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o registro A058F53 (*Ucides cordatus*) e A882584 (*Hypnea musciformis*).

#### 4.1.1 Obtenção da carragenana

##### 4.1.1.1 Tratamentos das algas

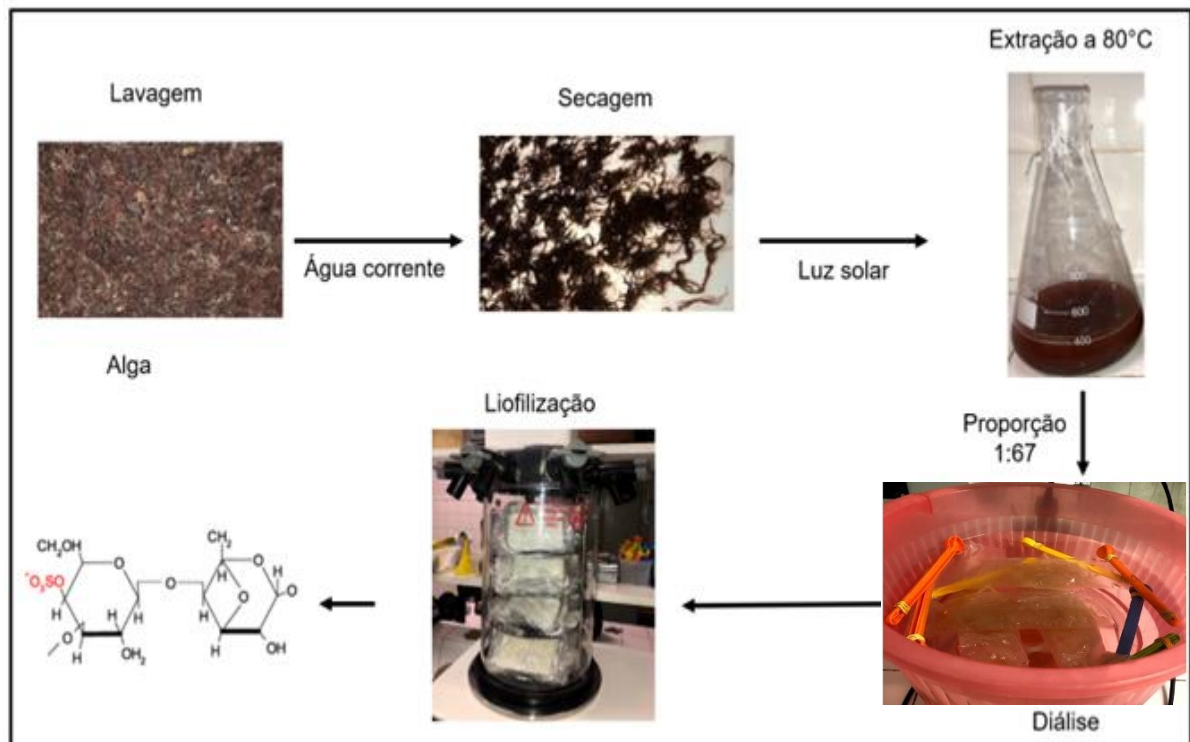
A alga *Hypnea musciformis* foi coletada na Praia do Flecheiras na cidade de Trairi no Estado do Ceará, sendo armazenada em caixa isotérmica com gelo e transportada ao Laboratório Tecnologia do Pescado (LATEPE). A alga passou por um processo de lavagem com água corrente, sendo finalizado com água destilada. Posteriormente a alga foi seca exposta a luz do sol para até a secagem completa. Após secagem a alga foi cortada com o auxílio de uma tesoura para facilitar o processo de extração com maior área de contato.

##### 4.1.1.2 Processo de extração

A metodologia empregada está de acordo com as recomendações de (Rodrigues *et al.* 2011). Inicialmente houve a extração em temperatura ambiente com água destilada na proporção 1:67 (m/v). O passo seguinte foi a extração a 80°C por 4 horas, posteriormente a precipitação do polissacarídeo foi realizada com uso de álcool 96<sup>®</sup> na proporção de 1:3 (v/v) para a formação de géis, cujo permaneceu 12 horas a 4°C por sob refrigeração. Com a finalidade de retirada do álcool, o polímero passou pelo processo de diálise em membranas de celulose (Sigma-Aldrich, 76 mm) em água destilada no volume de 1,87 litros com trocas a cada 3 horas de 6 a 8 vezes. Após a diálise a carragenana foi liofilizada em um liofilizador

L101 (Marca Lítop, Serie; 39413, Brasil) a uma pressão entre 400 a 300  $\mu\text{Hg}$  em uma temperatura  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 75 horas de acordo com a Figura 1.

Figura 1. Fluxograma do processo de extração da carragenana.



Fonte: elaborada pelo autor (2023).

## 4.1.2 Obtenção da quitosana

### 4.1.2.1 Tratamentos dos resíduos e produção da farinha

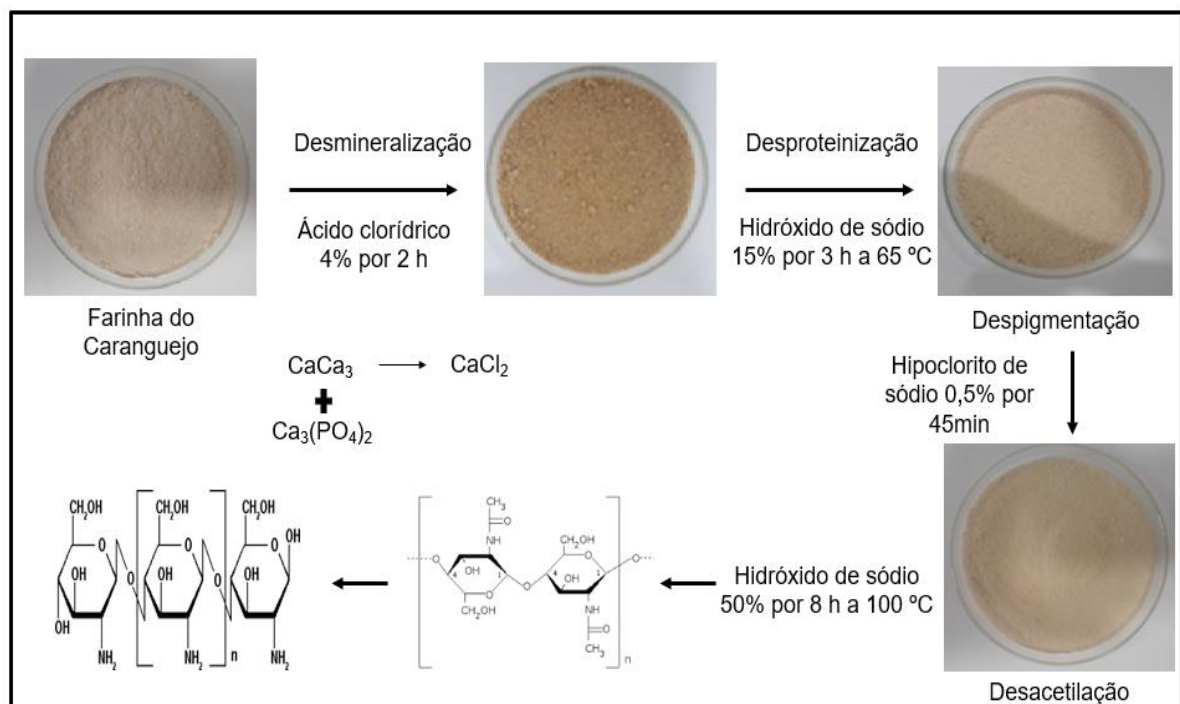
A carapaça de caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) foi adquirida em um Restaurante do município de Fortaleza e levadas ao Laboratório de Tecnologia do Pescado, posteriormente foram lavadas para a remoção de todos os resíduos e secas em uma estufa de recirculação de ar em  $50^{\circ}\text{C}$ . Após o resfriamento as carapaças foram trituradas em liquidificador Philips Walita (R17630) para obtenção da farinha do caranguejo.

### 4.1.2.2 Processo de extração

Inicialmente, ocorreu a desmineralização utilizando-se 4% de ácido clorídrico na proporção de 1:20 (m/v) sob agitação magnética por 2 h em temperatura ambiente. O próximo passo foi a desproteínização, utilizando-se 15% de

hidróxido de sódio na proporção de 1:10 (m/v) sob agitação magnética a 65 °C por 3 h. Na terceira etapa foi a despigmentação, com a utilização de 0,5% de hipoclorito de sódio na proporção 1:25 (m/v) sob agitação magnética a 40 °C por 40 minutos. Já na última etapa que é a desacetilação, com utilização de 50% de hidróxido de sódio na proporção de 1:40 (m/v) sob agitação magnética a 100 °C por 8 h, de acordo com a Figura 2. Em todos os processos a matéria-prima resultante de cada etapa foi lavado com água destilada até pH neutro e posteriormente foi seca em uma estufa de recirculação a 60°C por 12 h. A extração foi realizada de acordo (VALE *et al.* 2020).

Figura 2. Fluxograma do processo de extração da quitosana.



Fonte: elaborada pelo autor (2023).

## 4.2 Análise antimicrobiana dos revestimentos eletrolíticos

### 4.2.1 Teste preliminar da pureza dos revestimentos

Primeiramente foram testadas as purezas das soluções eletrolíticas, sendo produzidas de acordo com subitem 4.4.3. As três concentrações de carragenana e quitosana de 0,2, 0,4 e 0,6% (m/v) foram testadas em ágar PCA, pela técnica do *spread plate*. Inicialmente, adicionou 100 µL na placa duplicata para cada concentração das soluções. Posteriormente, as placas foram acondicionadas em

estufa a 35°C por 24h. Para as soluções de quitosana não houve crescimento bacteriano, entretanto, nas soluções de carragenana houve contaminação. Por este motivo, foi realizado um processo de esterilização, na qual pela técnica da luz ultravioleta não observou efeito positivo, no entanto, houve uma redução significativa das colônias com álcool 70%, mas sem observar a esterilização. Contudo, uso da autoclave a 121°C por 15 min foi eficiente. Só então foi realizado o teste antimicrobiano.

#### **4.2.2 Bactérias-teste**

A avaliação da atividade antimicrobiana para as soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana nas concentrações 0,2, 0,4 e 0,6% (m/v) foram realizadas para 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 triptona de soja (TSA) e, para o caso específico de *Vibrio parahaemolyticus*, foi adicionado 1% (m/v) de NaCl na composição do TSA. As cepas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 h.

#### **4.2.3 Preparo e análise dos inóculos bacterianos**

Das culturas crescidas em TSA a 35°C por 24 h, foi retirada uma porção do inóculo e homogeneizada em 9 mL de solução salina 0,85% de cloreto de sódio (m/v) para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella entérica* e 9 mL de solução salina 1,0% de cloreto de sódio (m/v) para *Vibrio parahaemolyticus* até se obter uma turvação equivalente à turbidez 0,5 na escala de McFarland. A absorbância foi aferida em espectrofotômetro, 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 cepa da 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 entérica* e com adição de 1% de NaCl (m/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 três poços de 6 mm de diâmetro com o auxílio de um perfurador inox esterilizado (BALOUIRI *et al.* 2016). Em cada poço foi adicionado uma alíquota de 50 µL das soluções eletrolíticas de carragenana 0,2%, 0,4% e 0,6% (m/v), o mesmo procedimento foi realizado para soluções eletrolíticas de quitosana nas mesmas concentrações. Após, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 48 h.

Decorrido esse período de incubação, cada placa foi conferida para avaliação da atividade antimicrobiana. A presença de um halo transparente ao redor dos poços confirmou o resultado positivo da ação antimicrobiana das soluções eletrolíticas.

### **4.3 Análises antioxidantes**

#### **4.3.1 Capacidade do sequestro dos íons radicais livres DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazila)**

A capacidade de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi determinada de acordo com a metodologia de Blois (1958), descrita por Duan *et al.* (2006) e Kato *et al.* (2016), com algumas modificações.

Nos poços denominados amostra, foram adicionados, separadamente, 10 µL das soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana, nas concentrações 0,2%, 0,4% e 0,6%, e 190 µL da solução metanólica de DPPH (D9132, Sigma) a 78 µM. Nos poços denominados brancos da amostra foram colocados 10 µL das soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana e 190 µL de metanol. Nos poços denominados controle negativo foram adicionados 190 µL da solução metanólica de DPPH a 78 µM e 10 µL de metanol.

O L-ácido ascórbico (A5960, Sigma), um flavonoide natural, foi utilizado como controle positivo, nas concentrações 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1.000 µg/mL, sendo tratado de forma idêntica às soluções dos polissacarídeos.

As microplacas de poliestireno de 96 poços denominados amostra, branco da amostra, controle negativo e controle positivo foram incubadas à temperatura ambiente por 30 min no escuro. Em seguida, as absorbâncias foram monitoradas a 517 nm (Biochrom Asys, modelo UVM 340). A capacidade de

sequestro do radical DPPH das soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana para o controle positivo, expressa em porcentagem, foi calculada pela EQUAÇÃO 1, e apresentada como média  $\pm$  desvio padrão.

$$\text{DPPH} = \frac{[Abs_{\text{controle negativo}} - (Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco}})]}{(Abs_{\text{controle positivo}})} \times 100\% \text{ Equação 1}$$

#### 4.3.2 Capacidade quelante de íons ferrosos (FIC)

A determinação do poder de quelação de íons ferrosos (FIC) foi baseada em Decker e Welch (1990) e descrita por Wang, Jónsdóttir e Ólafsdóttir (2009).

Nos tubos denominados amostra, contendo, separadamente, 100  $\mu\text{L}$  das soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana, nas concentrações 0,2%, 0,4% e 0,6%, foram adicionados 135  $\mu\text{L}$  de água destilada, 5  $\mu\text{L}$  de cloreto ferroso ( $\text{FeCl}_2$ ) a 2 mM e 10  $\mu\text{L}$  de ferrozina a 5 mM. Nos tubos denominados brancos da amostra, a ferrozina foi substituída por água destilada, enquanto nos tubos denominados controle negativo, os volumes das soluções eletrolíticas foram substituídos por água destilada.

Como controle positivo foi utilizado o sal dissódico etilenodiamino tetraacético (EDTA) ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – E5134, Sigma), nas concentrações 50, 100, 250, 500, 1.000, 1.500, 2.000 e 2.500  $\mu\text{g/mL}$ , sendo tratado de forma idêntica às soluções eletrolíticas.

Todos os tubos (amostra, branco da amostra, controle negativo e controle positivo) foram incubados por 10 min à temperatura ambiente, e as absorbâncias monitoradas a 562 nm (Biochrom Asys, modelo UVM 340).

O poder de quelação de íons ferrosos (FIC) das soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana e do controle positivo, expresso em porcentagem, foi calculado pela EQUAÇÃO 2, sendo apresentado como média  $\pm$  desvio padrão.

$$\text{FIC (\%)} = \frac{[Abs_{\text{controle negativo}} - (Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco}})]}{Abs_{\text{controle positivo}}} \times 100\% \text{ Equação 2}$$

#### 4.3.3 Poder redutor dos íons férricos (FRAP)

O poder de redução de íons férricos (FRAP) foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Khatua, Roy e Acharya (2016).

Aos tubos contendo 0,5 mL das soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana, nas concentrações 0,2%, 0,4% e 0,6%, foram adicionados 1,25 mL de tampão fosfato a 0,2 M (pH 6,6) e 1,25 mL de ferricianeto de potássio a 1%, os quais foram mantidos em banho-maria por 20 min a 50°C.

Após incubação e resfriamento dos tubos, a reação foi interrompida pela adição de 1,25 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Os tubos foram centrifugados e 2 mL da camada superior da mistura reacional foram retirados e misturados com 2 mL de água destilada e 0,4 mL de cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>) a 0,1%.

Os tubos foram incubados por 10 min em temperatura ambiente. Depois disso, as absorvâncias foram monitoradas a 700 nm (Biochrom Asys, modelo UVM 340).

Como controle positivo foi utilizado o antioxidante sintético, butil hidroxianisol (BHA - Sigma B1253) nas mesmas concentrações 50, 100, 250, 500, 1.000, 1.500, 2.000 e 2.500 µg/mL, sendo tratado de forma idêntica às soluções eletrolíticas.

Os resultados do FRAP foram apresentados em três casas decimais, pois corresponderam às leituras das absorvâncias geradas pela leitora.

#### **4.3.4 Atividade inibitória do branqueamento do $\beta$ -caroteno (BCB)**

A atividade inibitória do branqueamento do  $\beta$ -caroteno (BCB) das soluções de quitosana e carragenana, nas concentrações 0,2%, 0,4% e 0,6%, foi determinada em microplacas de poliestireno de 96 poços, usando-se o sistema  $\beta$ -caroteno e ácido linoleico (DUAN *et al.* 2006).

Inicialmente, uma alíquota de 4 mL de uma solução de  $\beta$ -caroteno (C9750, Sigma), preparada em clorofórmio na concentração de 1 mg/mL, foi transferida para um balão contendo 40 mg de ácido linoleico (L1376, Sigma) e 400 mg de Tween 40 (P1504, Sigma). Em outro balão, foram colocados 4 mL de clorofórmio, 40 mg de ácido linoleico e 400 mg de Tween 40.

O clorofórmio foi evaporado de ambos os balões em rota evaporador (Fisatom, modelo 802) sob pressão e, em seguida, 100 mL de água destilada saturada de oxigênio foram adicionados lentamente ao resíduo semissólido, sob vigorosa agitação por 1 min até a formação de uma emulsão estável. A primeira foi

denominada emulsão com  $\beta$ -caroteno (EC $\beta$ ), e a segunda, emulsão sem  $\beta$ -caroteno (ES $\beta$ ), que foi utilizada no branco da amostra.

Nas microplacas foram preparados poços denominados amostra (50  $\mu$ L das soluções eletrolíticas de polissacarídeos + 200  $\mu$ L da EC $\beta$ ), branco da amostra (50  $\mu$ L das soluções eletrolíticas dos polissacarídeos + 200  $\mu$ L da ES $\beta$ ) e controle negativo ou controle da amostra (50  $\mu$ L de MeOH + 200  $\mu$ L de EC $\beta$ ).

As microplacas foram deixadas sobre a bancada, à temperatura ambiente (20 a 23°C), e as absorbâncias foram monitoradas a 470 nm (Biochrom Asys, modelo UVM 340) no tempo inicial (0 min) e em intervalos de 30 min, até completar 300 min (tempo final).

O L-ácido ascórbico (A5960, Sigma), nas concentrações de 50, 100, 250, 500, 1.000, 1.500, 2.000 e 2.500  $\mu$ g/mL foi utilizado como controle positivo, sendo tratado de forma idêntica às soluções eletrolíticas dos polissacarídeos.

A atividade inibitória do branqueamento do  $\beta$ -caroteno (BCB), ou seja, a atividade de proteção sobre o  $\beta$ -caroteno, das soluções dos polissacarídeos e do controle positivo, foi calculada pela EQUAÇÃO 3 (DHONGADE; CHANDEWAR, 2013), e os resultados, expressos em porcentagem, foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, em duas casas decimais.

$$\text{BCP} = \left( \frac{\text{Abs}_{\text{AMOSTRA}} - \text{Abs}_{\text{BRANCO}} \text{ tempo final}}{\text{Abs}_{\text{AMOSTRA}} - \text{Abs}_{\text{BRANCO}} \text{ tempo inicial}} \right) \times 100\% \quad \text{Equação 3}$$

#### **4.4 Critério de escolha e elaboração dos revestimentos em camada intercalada.**

##### **4.4.1 Critério de escolha para aplicação dos revestimentos eletrolíticos em filés de atum**

O critério de escolha para aplicação dos revestimentos eletrolíticos foi com base nos resultados obtidos a partir da atividade antimicrobiana e antioxidante das soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana nas concentrações de 0,2%, 0,4% e 0,6% (m/v). A solução eletrolítica de carragenana e quitosana 0,6% apresentaram melhor desempenho na atividade antioxidante, por isto foi selecionado para aplicação do revestimento em filés de atum com base nos itens 5.1 e 5.2. A outra solução eletrolítica, o revestimento na concentração 0,2%, com menor



potencial na atividade antioxidante também foi selecionada para efeito de comparação, além disso, um terceiro tratamento com filés de atum sem revestimento (*in natura*).

#### **4.4.2 Os Tratamentos para shelf life em filés de atum**

Para a análise do *shelf life* em filés de atum, foram elaborados 3 tratamentos, um teste controle sem aplicação dos revestimentos em multicamadas, um revestimento em multicamadas na concentração 0,2% (m/v) e um revestimento em multicamada na concentração 0,6% (m/v), por um período de estocagem de 20 dias, tendo um intervalo 5 dias para cada dia de análise. Os filés de atum utilizados foram compostos por 30 unidades com aproximadamente 160-180 g, sendo duas unidades para a composição de cada tratamento, realizando 3 repetições por amostragem a cada dia de análise, totalizando 6 repetições para as análises físico-químicas conforme os tratamentos a seguir;

- Controle (C) – filé de atum *in natura* mantido sob refrigeração.
- Revestimento em multicamada intercalada na concentração 0,2% (m/v) de carragenana e quitosana – os filés de atum foram revestidos com 3 camadas (carragenana/quitosana/carragenana) mantidos sob refrigeração.
- Revestimento em multicamada intercalada na concentração 0,6% (m/v) de carragenana e quitosana – os filés de atum foram revestidos com 3 camadas (carragenana/quitosana/carragenana) mantidos sob refrigeração.

Contudo, um *pool* com os filés foram utilizados para cada dia de amostragem para a análise microbiológica.

#### **4.4.3 Produção dos revestimentos eletrolíticos**

A carragenana foi dissolvida em água destilada estéril nas concentrações 0,2%, 0,4% e 0,6% (m/v), para realização da atividade antimicrobiana e antioxidantes, sendo aplicados nos filés somente as concentrações 0,2% e 0,6% (m/v). A solução de carragenana foi homogeneizada usando um agitador magnético a 300 rpm por 2 h e 30 min em temperatura ambiente (24°C), posteriormente foi

elevada a temperatura para 50°C por 30 min para completa solubilização em cada concentração.

Após a produção da solução de carragenana, a amostra foi neutralizada por meio de uma solução de ácido clorídrico 0,1 M para o ajuste do pH em 7, com o intuito de produzir a solução eletrolítica da carragenana. Cada solução eletrolítica foi esterilizada em uma autoclave a 121°C por 15 min. Após serem resfriadas foram armazenadas a 4°C para posterior aplicação em filés de atum.

O mesmo critério foi atribuído para a quitosana, sendo dissolvido em ácido láctico 1% (m/v) nas concentrações 0,2%, 0,4% e 0,6% (m/v), para realização da atividade antimicrobiana e antioxidantes, sendo aplicados nos filés somente as concentrações 0,2% e 0,6% (m/v). Cada solução de revestimento de quitosana foi homogeneizada usando um agitador magnético a 300 rpm por 2 h em temperatura ambiente (24°C).

Após a produção da solução de quitosana, foi utilizado o ácido láctico 0,1 M para ajuste do pH 3, com o intuito de criar o revestimento eletrolítico de quitosana, sendo armazenados a 4°C, para posterior aplicação em filés de atum.

#### **4.4.4 Aplicação dos revestimentos eletrolíticos em multicamadas**

O método de aplicação consistiu na pulverização (*spray*) em camada intercalada da solução eletrolítica sobre os filés de atum congelados. A primeira camada do revestimento aplicada foi por meio da solução eletrolítica de carragenana a 4°C, após aplicação no filé, o excesso do revestimento foi drenado em uma grelha de aço inoxidável por 60 s, em seguida, foi mantido a -15 °C por 5 min para a fixação da camada. Posteriormente, a segunda camada do revestimento aplicada foi da solução eletrolítica de quitosana a 4°C, após aplicação no filé, o excesso do revestimento foi drenado em uma grelha de aço inoxidável por 60 s, em seguida, foi mantido a -15 °C por 5 min para a fixação da camada. Por fim, a terceira camada do revestimento aplicada foi por meio da solução eletrolítica de carragenana a 4°C, após aplicação no filé, o excesso do revestimento foi drenado em uma grelha de aço inoxidável por 60 s, em seguida, foi mantido a -15 °C por 5 min para a fixação da camada. Os filés foram acondicionados em bandeja de isopor fechado, sendo etiquetados e armazenados em refrigerador (Brastemp) a temperatura  $1 \pm 0,3^\circ\text{C}$

durante 20 dias. As concentrações de 0,2% e 0,6% foram utilizadas para aplicação dos revestimentos.

#### **4.4.5 Cálculo do preço dos revestimentos por kg de atum**

A determinação do preço do revestimento foi estimada em relação ao volume de revestimento gasto por quilo do pescado. O cálculo foi realizado com o volume gasto (mL) x preço do revestimento de cada camada (R\$), sendo determinado o preço das concentrações de 0,2 e 0,6% (m/v) de carragenana e quitosana, considerando os gastos com os reagentes utilizados em cada processo de extração, contudo, não foram considerados os gastos com eletricidade e água.

### **4.5 Análise físico-químicas para o tempo de prateleira**

#### **4.5.1 Determinação do pH**

O potencial hidrogeniônico foi medido com auxílio de pHmetro digital (Kasvi modelo K39-1014B) a partir da homogeneização de 10 g do músculo do filé do atum que foi macerada com 100 mL de água destilada por 30 segundos de acordo com a metodologia citada nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008)

#### **4.5.2 Determinação do nitrogênio das bases voláteis totais (N-BVT)**

Para a preparação do extrato, 100 g do músculo do filé de atum foi pesado, previamente triturada em multiprocessador Philips Walita (R17630), sendo macerado com 200 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 7,5% (m/v), e permaneceu em repouso por 5 min. Logo após o homogeneizado foi filtrado em papel de filtro para obtenção do extrato.

No tubo de destilação foi adicionado 25 mL do extrato filtrado com 5 mL de hidróxido de sódio 10% (m/v). Utilizou-se, ainda, 10 mL ácido bórico 4% (m/v) e 0,04 mL de indicador misto (vermelho de metila e verde de bromocresol) em um *erlenmeyer* para receber a formação das bases voláteis no processo de destilação. O N-BVT foi medido de acordo com a metodologia de Malle & Tao (1987). A destilação foi realizada no destilador de Nitrogênio (TECNAL modelo TE-036/1) até obter o volume total de 50 mL de solução no *erlenmeyer*. A quantidade de N-BVT foi calculada a partir do volume de ácido sulfúrico 0,1 N utilizado para a titulação. Os

valores foram expressos em mg de N-BVT/100 g do filé de atum e calculado através da equação a seguir:

$$\text{N-BVT} = n \times 16,8 \text{ mg de nitrogênio} / 100 \text{ g Equação. 4}$$

Onde:

n = mL de ácido sulfúrico gasto na titulação

#### **4.5.3 Determinação do nitrogênio da trimetilamina (N-TMA)**

A medição do nitrogênio da trimetilamina (N-TMA) de acordo com a metodologia de Malle & Tao (1987), realizada com o mesmo procedimento do nitrogênio das bases voláteis totais (N-BVT), enquanto a única diferença foi a adição de 20 mL de formaldeído a 16% (v/v) no tubo de destilação para bloquear aminas primárias e secundárias e permitindo reação apenas das aminas terciárias. O N-TMA foi calculado a partir do volume de ácido sulfúrico 0,1 N usado para titulação da seguinte forma:

$$\text{N-TMA} = n \times 16,8 \text{ mg de nitrogênio} / 100 \text{ g Equação. 5}$$

Onde:

n = mL de ácido sulfúrico gasto na titulação

#### **4.5.4 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

A oxidação do lipídio das amostras foi realizada por medição de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como descrito por Vyncke (1970).

Para a preparação do extrato foi pesado 10 g do músculo do filé do atum e posteriormente foi macerado em 50 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 7,5% (m/v), ficando em repouso por 5 minutos. Logo após este tempo, o homogeneizado foi filtrado em papel de filtro para obtenção do extrato, 5 mL da solução do extrato com 5 mL do ácido tiobarbitúrico a 0,02 M foi adicionado em tubo de vidro, sendo homogeneizados com auxílio de um agitador de tubos (Vortex modelo QL-901). Para o branco utilizou-se 5 mL ácido tiobarbitúrico e 5 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 min e posteriormente resfriado em água com o intuito de barrar a reação.

Para encontrar o valor de TBARS em mg de malonaldeído /equivalentes/kg músculo do filé do atum foi construída uma curva padrão a partir de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP). A evolução da oxidação da gordura foi acompanhada pela alteração da concentração de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico.

## **4.6 Análise microbiológica para o tempo de prateleira**

### **4.6.1 Bactérias psicrótróficas**

A quantificação de bactérias psicrótróficas 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). Foi macerados 25 g de músculo do filé de atum, e em seguida foi homogeneizado em 225 mL de solução salina a 0,85% de NaCl, correspondendo à diluição de  $10^{-1}$ . Deste homogeneizado, foi retirada uma alíquota de 1 mL e diluída em 9 mL de solução salina a 0,85%, correspondendo à diluição  $10^{-2}$ , e assim sucessivamente até a diluição  $10^{-5}$ .

A técnica utilizada para o preparo de cada placa foi a do *pour plate* para dois exemplares de filés de atum de cada tratamento. A diluição de cada tratamento foi homogeneizada com auxílio de um agitador de tubo (Vortex modelo QL-901). De cada diluição foi retirada uma alíquota de 1 mL e inoculada em placas de Petri, em duplicata, na qual foi adicionado 15 mL de ágar padrão para contagem (PCA) pela técnica de semeadura em placa (*pour plate*) (SWANSON, PETRAN, HANLIN, 2001). As placas para contagem de bactérias psicrótróficas foram invertidas e incubadas a temperatura de 7°C por 10 dias em estufa de incubação do tipo DBO (QUIMIS modelo Q 315M26).

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).

#### 4.6.2 Bactérias produtoras de histamina (BPH)

A metodologia para a detecção e quantificação das bactérias produtoras de histamina foi realizada segundo Niven, Jeffrey e Corlett (1981) com modificações. Para o preparo do meio para bactérias produtoras de histamina (BPH), foram utilizados 0,5% de caldo triptona, 0,5% extrato de levedura, 2,0% L-histidina 2HCl, 0,5% de NaCl, 0,1% de CaCO<sub>3</sub>, 2,0% ágar e 0,006% do indicador púrpura de bromocresol (pH 5,3). Após completa homogeneização, com o auxílio de um bastão de vidro e micro-ondas, o meio de cultura foi autoclavado por 10 min. Depois foi dividido 15 mL em placas de Petri.

Para a análise foi utilizado o muco da pele do atum, tendo o método do esfregaço usando *swab* em solução salina 0,85% de NaCl em uma área total de 25 cm<sup>2</sup>. As amostras foram então submetidas a diluições seriadas de 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-5</sup> usando solução salina de 0,85% de NaCl como diluente. Alíquotas de 100 µL de cada tratamento foi inoculada, pela técnica de *spread plate*, em duplicata, em meio de bactérias produtoras de histamina (BHT). Depois de homogeneizadas, as placas serão incubadas em estufa a 35°C durante 48 horas.

Após o período de incubação, as placas das diluições com crescimento entre 25 e 250 colônias foram escolhidas para o cálculo das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), segundo recomendações de Downes e Ito (2001). Além da contagem do total de colônias, foram contadas as colônias com coloração roxa e com halo.

Os resultados das contagens para o muco da pele da cavala foram expressos em Log UFC/cm<sup>2</sup>, utilizando a Equação 6.

$$\text{Log UFC/cm}^2 = \text{Log} \left( \left( \frac{a+b}{2} \times 10^n \times FC \right) \div 25 \right) \text{ Equação. 6}$$

Onde;

a e b = contagem placas em duplicata;

10<sup>n</sup> = inverso da diluição;

FC = fator de correção (fator de correção igual a 10, para *spread plate* feito com 100 µL).

#### **4.7 Análise Estatística**

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%, no entanto, a comparação para a atividade antioxidante para os dois polissacarídeos (carragenana e quitosana) na mesma concentração foram comparadas pelo teste *t* de Student não-pareado unilateral. A análise estatística foi realizada utilizando o software STATISTICA (versão 10, STATISTICA Statsoft Inc., US).

## 5 RESULTADOS e DISCUSSÕES

### 5.1 Determinação da atividade antimicrobiana dos revestimentos eletrolíticos carragenana e quitosana *in vitro*

O resultado para a capacidade de inibição do crescimento das cepas padrões para as soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana por meio da técnica de poço. No presente estudo houve confirmação para a atividade antimicrobiana para as duas soluções eletrolíticas analisados em relação à três cepas testadas. As Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahemolyticus* e uma Gram-negativa *Escherichia coli*. Contudo, não havendo inibição no crescimento para *Salmonella entérica* (TABELA 1).

Tabela 1. Atividade antimicrobiana em poço para as soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana. Para a atividade positiva foi calculada o halo em cm, símbolo (-) indica ausência de atividade.

<b>Soluções eletrolíticas</b>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella entérica</i>	<i>Vibrio parahemolyticus</i>
Halo de inibição em cm				
<b>Carragenana 0,2%</b>	6,1	6,2	-	-
<b>Carragenana 0,4%</b>	6,2	6,2	-	6,1
<b>Carragenana 0,6%</b>	6,3	6,2	-	6,1
<b>Quitosana 0,2%</b>	6,1	6,2	-	-
<b>Quitosana 0,4%</b>	6,3	6,1	-	-
<b>Quitosana 0,6%</b>	6,1	6,1	-	6,1

Fonte: elaborada pelo autor (2023).



O conhecimento prévio de como os microrganismos agem por meio da atividade antimicrobiana em soluções de carragenana e quitosana ainda não está bem elucidado. Shannon e Abu-Ghannam (2016) reforçam o empenho para compreender e conhecer ação da atividade microbiana da carragenana, com a triagem na identificação de grupos secundários presente na classe das rodofíceas, entretanto, a função metabólica dos grupos funcionais ainda não foi totalmente elucidada. Contudo, há uma hipótese para a atividade antimicrobiana κ-carragenana (*Hypnea musciformis*) em relação aos grupos funcionais, que há presença de receptores de glicoproteínas capazes de reconhecer e se ligar a superfície da célula, e de alguma forma, promover a permeabilidade da membrana citoplasmática, ocasionando lise celular com o vazamento de proteínas e ligação ao DNA bacteriano (SOUZA *et al.* 2018b).

Para as soluções de quitosana, a ação bactericida ou bacteriostática já é bem conhecida na literatura e seu efeito está ligado ao seu peso molecular. A quitosana com um alto peso molecular, tem limitação ao romper a parede celular do microrganismo, tendo seu potencial antimicrobiano devido a ação quelante de metais essenciais, impedindo que os nutrientes sejam capturados, desempenhando uma atividade extracelular, enquanto a quitosana de baixo peso molecular possui uma função extracelular, além de uma ação intracelular, afetando a síntese de proteína e funções mitocondriais (KE *et al.* 2021). A atividade antimicrobiana é essencial na proteção dos alimentos perecíveis que sofrem com a degradação bacteriana, desse modo, os alimentos revestidos em multicamadas intercaladas de carragenana e quitosana manterão a qualidade com redução do crescimento destes micro-organismos.

A inibição do crescimento de bactéria seja pela inativação e/ou redução melhora a qualidade dos alimentos, além disso, a prevenção de doença. O instrumento normativo de número 60, do Ministério da Saúde (2019) informa limite específico para *Staphylococcus coagulase positiva*, *Escherichia coli* e ausência e *Salmonella* para pescado comercializado refrigerado ou consumido cru. A regulamentação tem como objetivo proteger a saúde do consumidor, devido a contaminação ou falta de controle de qualidade no processamento. Um crescimento desacerbado pode levar sérios problemas; desde a uma infecção intestinal no caso da *Escherichia coli* e infecções simples até pneumonia para *Staphylococcus aureus*.

Diante do exposto, a utilização de revestimento com ação antimicrobiana para o controle de bactéria relatada é essencial, desde a captura até o processamento final dentro de uma indústria. Os revestimentos eletrolíticos de carragenana e quitosana aplicados em indústria auxiliarão na redução de *E. Coli* e *S. aureus*, visto o risco de contaminação do pescado, por a falhas na higiene dos manipuladores, nos utensílios ou água contaminada.

Na indústria de pescado, mesmo com os protocolos estabelecidos, há possibilidade de contaminação durante o processamento do pescado. Sousa, Lourenço, Lehalle (2020) mencionaram problemas de contaminação em várias etapas do processamento: desde na recepção do pescado pela indústria, com presença de *Salmonela*, *E. coli* e víbrio, devido a falta de higiene na embarcação e/ou gelo utilizado, além disso, mesmo após a lavagem do pescado ainda houve a presença de *Salmonela* e *E. coli*, outro ponto analisado foi em relação com contaminação durante a filetagem com a presença de toxina de estafilocócica, sendo encontrada até mesmo no setor de embalagem com a presença de *E. coli*.

Nesse contexto, o pescado refrigerado ou consumido cru pode ser uma via de contaminação quando há falhas em pontos críticos de controles, sendo um perigo para o consumidor, contudo, a adição dos revestimentos eletrolíticos de carragenana e quitosana são técnicas funcionais que auxiliam e valorizam na preservação de alimentos perecíveis. No caso do pescado, mais especificamente do atum, seria interessante aplicação desta tecnologia de conservação, visto que é um pescado consumido cru, em pratos de sushi e sashimi.

## 5.2 Determinação da atividade antioxidante das soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana *in vitro*

### 5.2.1 Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

O sequestro dos radicais livres do DPPH é um método colorimétrico bastante utilizado para a determinação de atividade antioxidante, sendo considerado uma metodologia simples e de rápida aplicação. O DPPH é um radical livre estável, que é reduzido por compostos antioxidantes por transferência de um átomo de hidrogênio ou elétron (ROMANET *et al.* 2021). Este mecanismo é percebido em uma reação característica, com a mudança da cor roxo (DPPH•) para o amarelo (DPPH-H) (FLEIGER e FLIEGER, 2020).

Para as soluções eletrolíticas observavam-se uma variação no perfil do sequestro dos radicais livres (DPPH) com o aumento da concentração do revestimento eletrolítico de carragenana e quitosana testado (TABELA 2). No presente estudo, as concentrações de carragenana 4 e 6 mg/mL que equivale respectivamente 0,4 e 0,6% obtiveram o maior percentual de ação para o DPPH, sendo menos eficiente quando comparados com a quitosana, principalmente na concentração de 6 mg/mL ou 0,6%.

Tabela 2 - Capacidade de sequestro do radical DPPH das soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana nas concentrações 0,2%, 0,4% e 0,6%.

Concentração (%)	DPPH (%)	
	Carragenana	Quitosana
0,2	10,826 <sup>aA</sup> ± 0,959	20,685 <sup>aB</sup> ± 0,346
0,4	16,187 <sup>bA</sup> ± 1,280	21,104 <sup>aB</sup> ± 1,550
0,6	17,390 <sup>bA</sup> ± 0,508	26,865 <sup>bB</sup> ± 1,570

Fonte: elaborada pelo autor (2023).

Nas colunas, concentrações comparadas pela análise de variância e teste de Tukey: letras minúsculas iguais,  $p > 0,05$ ; letras minúsculas diferentes,  $p < 0,05$ .

Nas linhas, polissacarídeos comparados pelo teste t de Student não-pareado unilateral: letras maiúsculas iguais,  $p > 0,05$ ; letras maiúsculas diferentes,  $p < 0,05$ .

Na literatura existe uma variação para os valores do DPPH em carragenana extraída de polímeros naturais, mesmo para uma mesma espécie,

devido as regiões geográficas distintas, visto que a *Hypnea musciformis* tem uma vasta distribuição geográfica, o que acabam influenciando nas características biológicas dos polímeros. Além disso, existe outra questão em relação a dosagem aplicada, quanto maior a concentração maiores serão os efeitos para o DPPH. No presente estudo houve um efeito positivo com dosagens diferentes para a carragenana no DPPH, o que não foi observado em outro estudo apresentado por Souza *et al.* (2018), não existindo uma correlação direta com o aumento da concentração da carragenana (0,5, 1, 1,5 e 2 mg/mL) extraída da *Hypnea musciformis* coletada na praia de Flecheiras, Ceará, com valores inferiores a 3% para atividade do DPPH. Já em uma outra região geográfica, na vila Thiondi, no distrito de Ramanathapuram, Índia, evidenciou um efeito de 13,43% para o DPPH para mesma alga na concentração de 0,5 mg/mL (ARULKUMAR *et al.* 2020).

As diferentes atividades do DPPH entre as pesquisas estão ligadas também a sazonalidade (estação do ano) em uma mesma área geográfica, pois nessas regiões, os fatores abióticos podem proporcionar a formação de composto biológico específico como no caso de grupo fenólico, no sentido de suportar as variações destes fatores em períodos distintos. Os grupos fenólicos e flavonoides são importantes compostos biológicos encontrados nas algas vermelhas com capacidade antioxidante, principalmente para a preservação da oxidação de alimentos, contendo múltiplos grupos -OH, que tem capacidade de doar um próton ao DPPH, e assim neutralizar os radicais livres (ARULKUMAR *et al.* 2020).

Já as soluções eletrolíticas de quitosana do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) apresentaram valores superiores para o DPPH na concentração de 2 mg/mL quando comparado ao do camarão branco (*Penaeus indicus*) da indonésia, enquanto a concentração de 6 mg/mL os valores foram inferiores (KUSNADI *et al.* 2022). Kusnadi *et al.* (2022) reforçaram que o potencial antioxidante da quitosana está ligado ao seu grupo amino, principalmente para a quitosana com elevado grau de desacetilação, por apresentar maior quantidade de grupo amino livre para doação do próton do DPPH.

Quando analisando as duas soluções eletrolíticas do presente estudo, a quitosana apresentou melhor potencial do perfil do DPPH quando comparada com a carragenana, o que faz a combinação entre os polímeros diferentes ser uma boa estratégia na aplicação em alimentos. O revestimento construído camada por camada é uma estratégia que combina os potenciais de polímeros distintos, no caso

específico da atividade para o DPPH, a camada de quitosana auxiliaria com seu potencial de sequestro dos radicais livres, sendo mais efetiva quando comparada com a camada de carragenana, devido a maior capacidade de doação átomos de H. A combinação de 2 ou mais polímeros no revestimento em multicamada intercalada é uma tecnologia adequada para o aproveitamento da propriedade antioxidante.

### 5.2.2 Poder de quelação dos íons ferrosos (FIC)

A determinação do poder de quelação dos íons ferrosos é a capacidade da ferrozina em formar um complexo (quelante) que apresenta coloração rósea. Quando um outro composto compete pela ferrozina esta coloração diminui, devido o composto se ligar à mesma. Os resultados do poder de quelação de íons ferrosos (FIC) das soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana (TABELA 3) estão apresentados a seguir.

Tabela 3 - Poder de quelação de íons ferrosos (FIC) das soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana nas concentrações 0,2%, 0,4% e 0,6%.

Concentração (%)	FIC (%)	
	Carragenana	Quitosana
0,2	7,662 <sup>aA</sup> ± 1,904	26,922 <sup>aB</sup> ± 12,760
0,4	4,556 <sup>aA</sup> ± 0,549	33,143 <sup>aB</sup> ± 7,145
0,6	23,867 <sup>bA</sup> ± 4,540	38,782 <sup>aB</sup> ± 8,211

Fonte: elaborada pelo autor (2023).

Nas colunas, concentrações comparadas pela análise de variância e teste de Tukey: letras minúsculas iguais,  $p > 0,05$ ; letras minúsculas diferentes,  $p < 0,05$ .

Nas linhas, polissacarídeos comparados pelo teste t de Student não-pareado unilateral: letras maiúsculas iguais,  $p > 0,05$ ; letras maiúsculas diferentes,  $p < 0,05$ .

As soluções eletrolíticas de carragenana ou quitosana testados apresentaram a capacidade de habilidade de quelação dos íons (FIC). A solução de carragenana houve crescimento irregular quando comparada a concentração de quitosana. Contudo, a solução eletrolítica de quitosana obteve a melhor performance, com 38,78% de eficiente na quelação de íons ferrosos, enquanto concentração a solução de carragenana foi de 23,86%. Azaza *et al.* (2022) encontraram valor de 36% em filme de quitosana na concentração de 2% produzido a partir *Portunus segnis*, resultado similar ao encontrado para o caranguejo-uçá na

concentração de 0,6%. Quanto ao perfil no crescimento na concentração da solução de quitosana houve um aumento para a atividade dos íons ferrosos de uma forma mais regular, mas sem haver uma diferença significativa ( $p > 0,5$ ). O que pode ser destacado em relação a comparação entre os polímeros, é a maior capacidade da quitosana em relação a carragenana em uma possível proteção na oxidação lipídica.

A auto-oxidação lipídica é constituída por três fases (iniciação, propagação e terminação), o primeiro processo é a iniciação, cujo a mesma precisa de uma alta energia de ativação para a formação de radicais livres, por esse motivo, esta fase não ocorre espontaneamente, sendo necessária a presença de fatores que catalisam a reação (Baron *et al.* 2020). Os autores ainda relatam que no processo de propagação ocorre a ligação entre o radical com a molécula do oxigênio, originando o radical peroxila, nesta fase há o acúmulo de hidroperóxidos, porém, com o decorrer do tempo, por serem instáveis, começam a se decompor. Dessa forma, obtêm-se os compostos responsáveis pelo odor de ranço na oxidação lipídica. Os íons ferrosos são precursores da oxidação, principalmente em processo oxidativo com peróxidos. Vários são os mecanismos de oxidação lipídica, tendo alguns fatores como ponto chave no encadeamento do processo, como a própria luz do ambiente e os metais presentes nos alimentos.

O músculo do atum contém o íon ferro presente em uma quantidade mais significativa na parte mais escura, pois é peixe de natação ativa, que precisa da molécula de hemoglobina (ferro é elemento central na composição) para respiração devido a movimentação constante. Portanto, a carragenana e quitosana atuam no processo de evitar degradação do lipídio via formação de peróxido por meio dos íons metálicos. Baran *et al.* (2020) citam que o primeiro produto formado na deterioração dos lipídeos é o peróxido, sendo incolor e inodoro, por isto, é muito importante o uso de antioxidante para que não ocorra a formação de peróxido por meio da quelação do metal. Deste modo, o processo de formação de peróxido pode ser amenizado, com redução dos íons de ferros haverá a diminuição na formação de peróxidos.

Carragenana é polímero que protege contra o processo oxidativo, segundo Jiang *et al.* (2021) o grupo sulfato e peso molecular são dois fatores principais que atribuem à atividade antioxidante do carragenana, devido à estrutura dos polissacarídeos de alto peso molecular facilitar a captura de radicais livres produzidos pela reação de peroxidação lipídica e/ou com a complexação dos íons metálicos (Fe). Li *et al.* (2019) confirmam a capacidade de quelação dos íons ferros

para a quitosana, atribuindo aos grupos OH e/ou C=O, devido a ligação destes grupos aos metais.

Neste sentido, os revestimentos em multicamadas intercaladas entram como um auxílio na manutenção da qualidade dos lipídios presentes no pescado, cujo a camada de quitosana auxiliaria a camada de carragenana na proteção contra a formação peróxidos, sendo um ponto positivo, com a combinação dos polímeros, melhorando a potencialidade da aplicação dos revestimentos.

### 5.2.3 Poder redutor dos íons férricos (FRAP)

Uma opção promissora para analisar a atividade antioxidante é por meio o potencial de oxidação-redução, através da avaliação do poder de redução de íons férricos (FRAP), cujo íon férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) é reduzido ao íon ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) em uma reação redox evidenciando o poder antioxidante de uma amostra (HOSSAIN *et al.* 2021). Os resultados (FRAP) das soluções de carragenana e quitosana estão apresentados na (TABELA 4).

Tabela 4 - Poder de redução de íons férricos (FRAP) das soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana nas concentrações 0,2%, 0,4% e 0,6%.

Concentração (%)	FRAP (Abs 700 nm)	
	Carragenana	Quitosana
0,2	0,109 <sup>aa</sup> ± 0,002	0,108 <sup>aa</sup> ± 0,010
0,4	0,105 <sup>aa</sup> ± 0,003	0,124 <sup>bb</sup> ± 0,004
0,6	0,126 <sup>ba</sup> ± 0,001	0,159 <sup>cb</sup> ± 0,006

Fonte: elaborada pelo autor (2023).

Nas colunas, concentrações comparadas pela análise de variância e teste de Tukey: letras minúsculas iguais,  $p > 0,05$ ; letras minúsculas diferentes,  $p < 0,05$ .

Nas linhas, polissacarídeos comparados pelo teste t de Student não-pareado unilateral: letras maiúsculas iguais,  $p > 0,05$ ; letras maiúsculas diferentes,  $p < 0,05$ .

Na redução dos íons férricos houve um crescimento com o aumento das concentrações na presente pesquisa, tanto para as soluções eletrolíticas de carragenana como a de quitosana, foram observadas que as concentrações de 0,6% obtiveram os melhores resultados em ambos os tratamentos, no entanto, os valores de absorvência não foram muitos expressivos se comparado ao polifenol, butil-hidroxianisol (BHA) que é um antioxidante forte (APÊNDICE A).

Os íons de ferros estão presentes no sague dos peixes, sendo responsável pela auto-oxidação da gordura em pescado, desta maneira, a proteína da mioglobina e hemoglobina podem ser catalisadores da oxidação lipídica. A catálise metálica pode ser considerada como uma importante reação de oxidação lipídica no músculo do peixe, isto significa que após o processo de abate, o ferro da heme liberado na forma íon ferroso é convertido em íon férrico, sendo um precursor da auto-oxidação (HEMATYAR *et al.* 2019).

Nessa perspectiva, a redução dos íons férricos por meio das soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana, de acordo com Hematyar *et al.* (2019), retardaria o processo de oxidação, já que a sua valência influencia na auto-oxidação, amenizando o processo de oxidação lipídica. Fani (2014) afirma que o estado de valência influencia na oxidação das gorduras, porém o íon ferroso catalisa o processo de oxidação lipídica mais rapidamente do que íon férrico, indo contra os dados apresentados por Hematyar *et al.* (2019). Contudo, o efeito mais benéfico na redução do íon férrico é em relação a capacidade em doar um elétron no processo oxidativo, segundo Hajji *et al.* (2021) a doação do elétron, na redução de metais, é de grande importância pois pode encerrar reações em cadeia de radicais livres, convertendo esses radicais em produtos mais estáveis.

Estudos com a alga *hypnea muciformes* não conseguiram encontrar nenhum em efeito em compostos bioativos em algumas regiões do mundo, em regiões da Índia, Indonésia e Iran (HOSSAIN *et al.* 2021). Contudo, o presente estudo mesmo em baixa concentração apresentou capacidade na redução dos íons férricos em íons ferrosos. Já para a quitosana observou resultado semelhante ao encontrado na presente pesquisa, segundo Azaza *et al.* (2022) filme de quitosana apresentou efeito positivo para o FRAP. Quando comparados os dois tratamentos, a quitosana mais uma vez se sobressaiu em relação carragenana, evidenciando mais uma vez a importância das combinações entre polímeros distintos.

#### **5.2.4 Atividade inibitória do branqueamento do $\beta$ -caroteno (BCB)**

O método de branqueamento com  $\beta$ -caroteno (BCB) é um modelo rápido e utilizado para triagem de atividade antioxidante, através do princípio em que um ácido graxo insaturado representado pelo ácido linoleico (C18:2) é oxidado pelo oxigênio reativo, produzido por uma água oxigenada, sendo um oxidado resultante, evidenciado pela descoloração de  $\beta$ -caroteno (ROHMAN *et al.* 2020). O  $\beta$ -caroteno



sofre descoloração na ausência de um antioxidante, devido ao acoplada do  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico, que geram os radicais livres. Os resultados (BCB) das soluções de carragenana e quitosana estão presentes na (TABELA 5).

Tabela 5 - Atividade inibitória do branqueamento do  $\beta$ -caroteno (BCB) das soluções eletrolíticas de quitosana e carragenana nas concentrações 0,2%, 0,4% e 0,6%.

Concentração (%)	BCB (%)	
	Carragenana	Quitosana
0,2	40,862 <sup>aA</sup> $\pm$ 0,445	8,693 <sup>aB</sup> $\pm$ 0,854
0,4	42,931 <sup>aA</sup> $\pm$ 1,745	12,997 <sup>aB</sup> $\pm$ 0,334
0,6	48,853 <sup>bA</sup> $\pm$ 2,080	13,353 <sup>bB</sup> $\pm$ 0,034

Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

Nas colunas, concentrações comparadas pela análise de variância e teste de Tukey: letras minúsculas iguais,  $p > 0,05$ ; letras minúsculas diferentes,  $p < 0,05$ .

Nas linhas, polissacarídeos comparados pelo teste t de Student não-pareado unilateral: letras maiúsculas iguais,  $p > 0,05$ ; letras maiúsculas diferentes,  $p < 0,05$ .

As soluções eletrolíticas de carragenana e quitosana apresentam efeitos distintos para o branqueamento do  $\beta$ -caroteno, sendo a carragenana mais efetiva na proteção, apresentando valores entre 40 a 48% nas concentrações utilizadas na presente pesquisa, havendo menor perda da coloração do amarelo/laranja das amostras analisadas em relação a quitosana, portanto, quanto maior a perda de coloração, menor a atividade antioxidante. A carragenana tem maior capacidade de manter o cromatóforo do  $\beta$ -caroteno, retendo a cor amarelo-laranja, com a eliminação dos radicais livres. Chew et al. (2008) afirmaram que o BCB serve apenas como indicativo dos níveis de compostos lipofílicos presentes e a presença de antioxidante capaz de neutralizar os radicais livres gerados pela oxidação do ácido linoleico e prevenir a descoloração do  $\beta$ -caroteno.

O BCB para o pescado, serve para indicativo no comportamento de como os polímeros em relação aos lipídeos insaturados devido aos ataques as duplas ligações que os compõem. O pescado é rico em lipídeo insaturado, o que é propício a degradação no processo de degradação das gorduras. Logo, o BCB serve como um indicativo para a proteção de outros ácidos graxos insaturados (duplas ligações) como o DHA (ácido docosa-hexaenóico) e EPA (ácido eicosapentaenóico) ricos no

pescado marinho. No processo de oxidação lipídica, as ligações entre os átomos de hidrogênios e carbonos são afetadas, que são dependendo dos *status* das ligações duplas entre os carbonos-carbonos e os números e a posições das ligações duplas, portanto, existe uma reação em cadeia, cujo o hidrogênio é o alvo fácil ao ataque dos radicais livres, além disso, quanto maior forem os números de ligações duplas, assim, as múltiplas ligações duplas em gorduras tornam-se alvos fáceis para o processo de iniciação, bem como de propagação da oxidação lipídica (HUANG e AHN, 2021)

O BCB é uma análise importante para uma simulação da degradação do ácido graxo polinsaturado, sendo as soluções eletrolíticas de carragenana mais eficiente na conservação, no entanto, para os outros métodos DPPH, FIC e FRAP as soluções eletrolíticas quitosana foram mais eficazes, desta forma, o que torna a construção do revestimento em multicamadas intercaladas mais adequada em pescado rico em gordura.

### **5.3 Custo de produção por camada dos revestimentos eletrolíticos de carragenana e quitosana.**

Os polímeros naturais são fontes de compostos biológicos de grande interesse para a indústria de alimento, apesar disso, ainda existe uma lacuna para a produção a baixo custo. Mesmo diante do desafio da produção de polímero natural a baixo custo, a metodologia para a extração de carragenana e quitosana esta bem desenvolvida. A determinação do preço para cada polímero na presente pesquisa foi estabelecida de acordo os modelos de extrações. Para a carragenana a cada 5 g foi obtido um rendimento final de 1,43 g ao custo de R\$ 8 reais, enquanto para a quitosana a cada 100 g foi obtido um rendimento final de 10,31 g por R\$ 17,20. O preço das três camadas na concentração 0,2% saiu por R\$ 7,62, enquanto na concentração 0,6% foi de 22,86 reais por kg do pescado (TABELA 6).

Tabela 6. Representa o custo de produção por camada do revestimento eletrolítico 0,2% e 0,6% de carragenana e 0,2% e 0,6% de quitosana.

<b>Extração</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Peso final (g)</b>	<b>Custo por reagentes (R\$)</b>
Carragenana	28,66%	1,43	8
Quitosana	10,34%	10,34	17,20
<b>Camada do revestimento por kg pescado</b>	<b>Custo (R\$) por camada</b>	<b>Volume gasto (mL)</b>	<b>-</b>
Carragenana 0,2%	3,31	300	-
Carragenana 0,6%	9,93	300	-
Quitosana 0,2%	1	300	-
Quitosana 0,6%	3	300	-

Fonte: elaborada pelo autor (2023).

O volume gasto mL foi calculado por meio revestimento aplicado por kg do filé de atum.

O custo inicial foi calculado através dos reagentes utilizados em cada extração, sem contabilizar outros fatores como água, sendo utilizando 25 litros para neutralizar os processos químicos da quitosana, enquanto no processo de diálise foi utilizada 15 litros para a carragenana, além da energia elétrica.

O desenvolvimento da presente pesquisa esta dentro de uma escala laboratorial, se modificado para uma escala industrial o custo de produção pode ser reduzido, para isto, é necessário investimento em pesquisa para que esse modelo laboratorial se torne economicamente viável. Os dados e os benefícios são comprovados, porém deve existe colaboração entre os pesquisadores e entre a indústria com finalidade viabilizar a produção dos revestimentos comestíveis.

Em escala industrial, os custos podem ser reduzidos das seguintes formas; com o desenvolvimento de equipamentos que otimizem a extração, a

comprar de reagentes em maior quantidade tornando o preço mais acessível, subsídios e incentivos fiscais que auxiliaria na redução dos custos de produção.

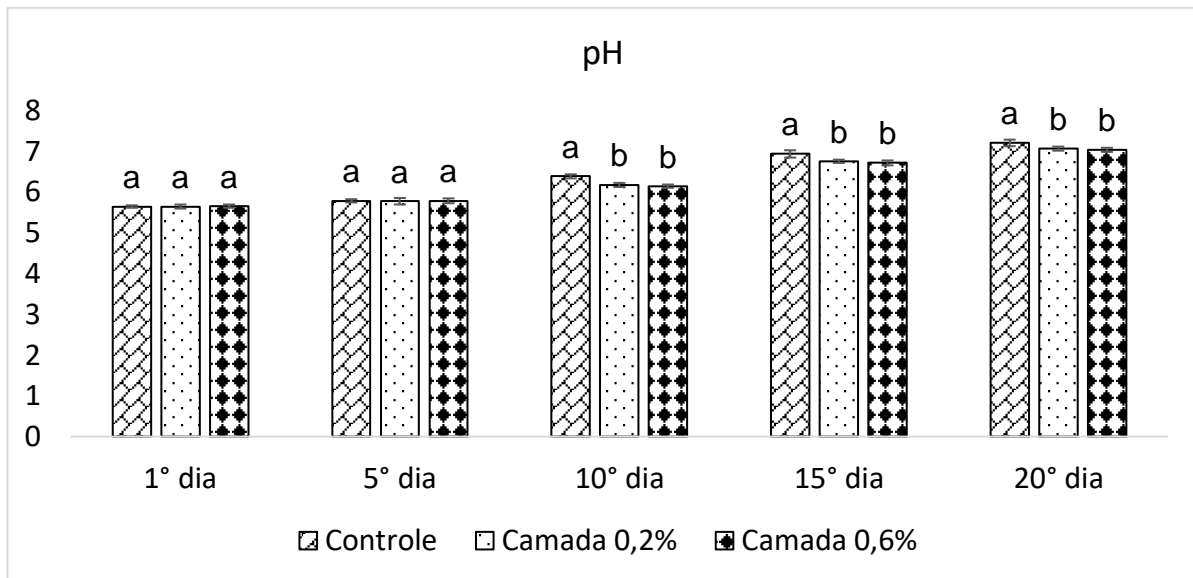
Outro aspecto que pode ser examinada é em relação a aplicação do revestimento no produto, sendo a técnica de aspersão a mais econômica com o intuito de amenizar o desperdício da aplicação, além disso, elaboração com menores concentrações sem a perda da atividade antimicrobiana e antioxidante.

#### **5.4 Análises físico-químicas para o tempo de prateleira**

##### **5.4.1 pH**

O GRÁFICO 1 apresenta o perfil do pH na presente pesquisa. Inicialmente os valores do pH mantiveram-se próximos entre (5,6-5,71) para os tratamentos analisados até o 5º dia, estes valores são considerados ácidos para o músculo do pescado de um modo geral, isso se deve pelo fato das funções metabólicas permanecem ativas, mesmo após o abate do pescado, ocorrendo a utilização da energia que ainda está armazenada no músculo. Duarte *et al.* 2020 relataram que no momento da morte do pescado, o peixe encontra-se em um estágio denominado de *pré-rigor*, no qual o glicogênio presente no músculo começa a ser mobilizado em uma reação metabólica, devido a interrupção da circulação sanguínea e dos mecanismos de defesa, acarretando pela interrupção do oxigênio, o que levar o início da degradação anaeróbica do glicogênio, fase essa denominada glicólise. Este processo provoca o gasto de ATP com a produção de ácido lático e consequentemente a redução do pH.

GRÁFICO 1. pH em filé de atum refrigerado a  $1 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  para o tratamento grupo controle (sem revestimentos), revestimento em camadas de 0,2% carragenana e quitosana e revestimento em camadas 0,6% carragenana e quitosana.



Fonte: elaborada pelo autor (2023).

Nas colunas para o mesmo dia de análise, foram comparados os grupos; controle, camadas 0,2% e 0,6% por teste de Tukey: diferença significativa para letras minúsculas distintas,  $p < 0,05$ .

O pH manteve-se estável no primeiro dia, mesmo na condição em que foi aplicado as camadas intercaladas de revestimentos, levando a compreensão que o revestimento neste primeiro momento não afetou esta análise física, visto que a temperatura estabilizou o inicial do pH. A temperatura é uma variável importante na manutenção da qualidade do atum, além disso, o cuidado inicial com a higiene e limpeza da embarcação, desde a captura, seguindo o fluxo até a comercialização pescado. Essas condições sendo respeitadas, em conjunto com o emprego da refrigeração melhora a qualidade do pescado. O que foi possível observar na presente pesquisa, em relação ao pH inicial, o mesmo encontrou-se entre o estágio de *pré-rigor* ao início do *rigor mortis* desde do primeiro dia, sendo um bom indicativo de qualidade.

Em contrapartida, o estágio de *pré-rigor*, não é estágio que ocorre por um período prolongo, este estágio permanece por horas a depender de alguns fatores. Entre as situações que aumentam o *pré-rigor* são as condições nutricionais no momento da captura, as espécies de tamanhos maiores e uma refrigeração rápida após a captura (GONÇALVES, 2021). Contudo, até o quinto dia, o pescado ainda permaneceu com o pH ácido, neste momento, o que pode ter influenciado foi em

relação ao crescimento bacteriana, já que normalmente a elevação do pH é acompanhada pela multiplicação de bactéria em utiliza o pescado como fonte de alimento, nutrindo-se das proteínas presentes no pescado e como consequência a produção de bases voláteis, elevando o pH no músculo do atum.

Portanto, as bactérias de alguma forma, não estavam aptas à condição de utilizar o pescado como forma de alimento. Quando o pescado morre e fica armazenado no gelo, os microrganismos presentes estão na fase de latência (chamada de *lag* ou *delay*) enquanto se adaptam ao novo ambiente (peixe morto), por meio do ajuste de sobrevivência e crescimento, devido à ausência de oxigênio (DUARTE *et al.* 2020). Os autores ainda reforçam que após adaptação ao novo ambiente, os microrganismos crescem exponencialmente, com o início da fase logarítmica (também chamada de *log*) constituindo o principal motivo da degradação dos peixes após o sexto dia em gelo.

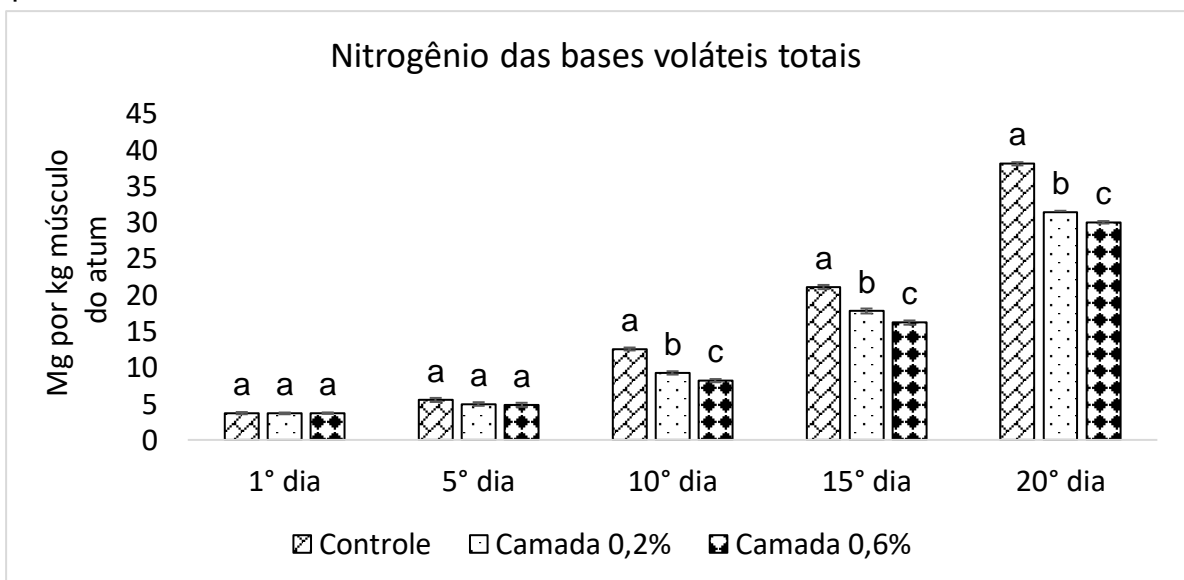
Com o passar dos dias, começou a observar a elevação do pH com diferença significativa ( $p < 0,5$ ) entre aplicação do camadas intercaladas em relação ao grupo, mais especificamente a partir do décimo dia, neste momento o revestimento tem um efeito sobre esta variável, as camadas intercaladas de carragenana e quitosana controlar mais o crescimento pH até do vigésimo dia. Entre o décimo e vigésimo dia de análise é possível verificar uma maior concentração de nitrogênio das bases voláteis totais (N-BVT) (FIGURA. 6), existindo uma relação direta entre o crescimento do pH com as bases voláteis totais, visto que quanto maior a degradação das proteínas, maiores serão os valores de pH. Além dos microrganismos, outro meio elevar o pH é através da autólise, enzimas proteolíticas endógenas ao pescado capazes de degradar as proteínas em aminoácidos para expor o grupo amino ( $\text{NH}_2$ ), levando o aumento do pH (HAO *et al.* 2022).

A camada intercalada de carragenana e quitosana foi um tratamento que auxiliou na redução do crescimento do pH durante o armazenamento dos filés de atuns refrigerados. Contudo, no vigésimo dia, conforme especificado no Regulamento de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (BRASIL, 2017), os valores do pH estão acima de 7, sendo impróprio para o consumo. Um ponto positivo está em relação as concentrações dos polímeros empregada na pesquisa, as variações entre as concentrações não influenciaram na análise, a concentração mais baixa de 0,2% é tão efetiva quanto a concentração três vezes maior que foi 0,6% ao longo dos dias de armazenamentos.

#### 5.4.2 Nitrogênio das bases voláteis totais

O nitrogênio das bases voláteis totais (N-BVT) é uma análise essencial quando se deseja estudar a qualidade do pescado, pois é uma forma de garantir que a proteína esteja disponível com seu valor nutricional para o consumidor. Já que quando degradada, a qualidade proteica do pescado fica comprometido. Na presente pesquisa para os valores de N-BVT ao se analisar o primeiro ao quinto dia, as bases voláteis totais permaneceram constantes entres os tratamentos variando entre (3,69-5,51 mg de nitrogênio/kg), como também retratam valores relativamente baixos, o que caracterizar o frescor do filé do músculo do atum. Segundo Rezende-Souza e Savay-Silva (2021), em peixes marinhos, o índice de N-BVT varia pouco nos primeiros dias de armazenamento, sendo que após a primeira semana de estocagem, os valores aumentam de forma exponencial. Como observado até o quinto dia de análise de acordo com a GRÁFICO 2.

Gráfico 2. Nitrogênio das bases voláteis em filé de atum refrigerado a  $1 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  para o tratamento grupo controle (sem revestimentos), revestimento em camadas de 0,2% carragenana e quitosana e revestimento em camadas 0,6% carragenana e quitosana.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Nas colunas para o mesmo dia de análise, foram comparados os grupos; controle, camadas 0,2% e 0,6% por teste de Tukey: diferença significativa para letras minúsculas distintas,  $p < 0,05$ .

No primeiro momento, a temperatura  $1 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  controlou o crescimento do N-BVT, isto se deve também, como já mencionado a adaptação da bactéria nos

primeiros dias, para que então possa crescer e utilizar as proteínas como fonte de alimento. Logo, a temperatura se mostrou eficiente na conservação do filé do atum, principalmente para as proteínas estruturais que requer um maior cuidado por seu alto valor biológico. As proteínas estruturais são porções importantes (70 a 90%), contudo, essas proteínas sofrem degradações após a morte do peixe sobre efeito de diferentes fatores, isto se deve por conta da qualidade biológica do pescado que contém todos os aminoácidos essenciais como lisina, triptofano, histidina, fenilalanina, leucina, isoleucina, treonina e valina (ADANDE *et al.* 2020). Além como aminoácidos contendo enxofre tais como metionina e cisteína (PAL *et al.* 2018).

A degradação proteica a partir do décimo dia, obteve um crescimento maior do grupo controle em relação as camadas intercaladas de carragenana e quitosana com diferença significativa ( $p < 0,5$ ), sendo perceptível até o vigésimo dia, entre esse intervalo de tempo o revestimento melhorou a qualidade do N-BVT. As bases voláteis totais são formadas a partir de compostos nitrogenados presente na proteína, segundo Bekhit *et al.* (2021), o desenvolvimento dos compostos N-BVT resultam do crescimento microbiano e da ação proteolítica de enzimas endógenas, após a depleção de glicose, cujas as bactérias prosperam por metabolizar os aminoácidos, levando ao rápido desenvolvimento de N-BVT e outros produtos de descarboxilação, o termo N-BVT descreve a soma total de amins primárias, secundárias e terciárias (amônia [ $\text{NH}_3$ ], metilamina [MA], dimetilamina [DMA] e trimetilamina [TMA]) na forma de voláteis e outros compostos de nitrogênio tóxicos.

As camadas intercaladas de carragenana e quitosana diminuíram o N-BVT em comparação ao grupo controle, em valores absolutos houve uma redução de 3,3 e 4,37 mg de nitrogênio por kg do pescado no décimo dia, respectivamente para as camadas intercaladas de 0,2 e 0,6%, esses valores aumentaram com os dias subsequentes. Este comportamento só é possível visto a ação antimicrobiana dos revestimentos aplicados. A combinação entre polímero diferente pode ser muito útil devido a propriedade funcional de cada polímero, Zang *et al.* (2019c) observou que ao utilizar quitosana com polilisina em conjunto com a carragenana houve uma melhora significativa na redução do crescimento das N-BVT para *Fenneropenaeus chinensis* refrigerado.

Quando se analisa as diferentes concentrações, houve uma diferença entre aplicação das camadas intercaladas de 0,2 e 0,6%, além disso, o grupo controle apresentou uma maior degradação, logo a maior concentração do polímero



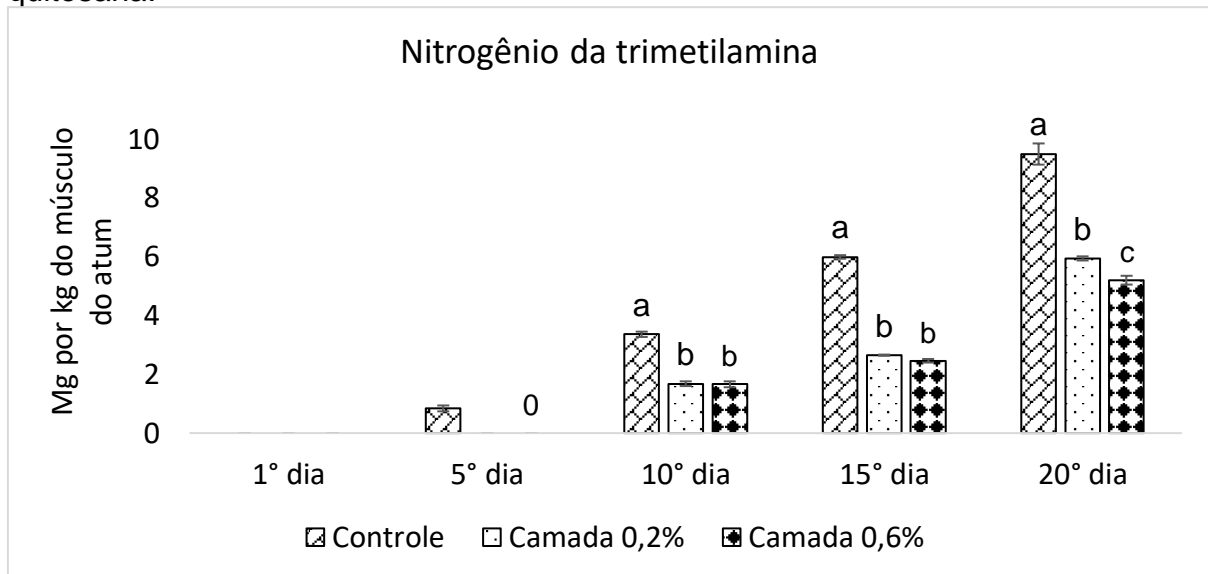
proporciona um efeito benéfico para o N-BVT, no entanto, após o vigésimo dia, todos os tratamentos não estão aptos para o consumo visto que os valores excedem o máximo permitido para o consumo. Para as bases nitrogenadas voláteis totais (N-BVT), conforme especificado no Regulamento de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (BRASIL, 2017), os valores acima de 30 mg de nitrogênio por kg do músculo de pescado, deve ser evitado, pois o mesmo não se encontra propício para o consumo humano. Diante disso, tanto a concentração 0,2 e 0,6% estão aptas para o consumo até o décimo quinto dia, com melhor conservação das proteínas pela concentração 0,6%.

#### **5.4.3 Nitrogênio da trimetilamina**

O nitrogênio da trimetilamina (N-TMA) é uma base utilizada como indicador de frescor em pescado e o seu acúmulo tem uma grande correlação com a deterioração do produto (WANG *et al.* 2021). No GRÁFICO 3 é possível observar a evolução da trimetilamina com a ausência no músculo do atum no primeiro dia de análise. O N-TMA é uma base formada a partir de um outro composto orgânico, mais especificamente do óxido da trimetilamina (OTMA), segundo Braga (2022), o OTMA está presente em peixes, em virtude da ação bacteriana e enzimas endógenas, do qual é reduzido em trimetilamina, corroborando com a degradação proteica, consequentemente com o aumento das bases voláteis totais.

A ausência da base do N-TMA no primeiro dia está mais relacionada com as bactérias não conseguirem metabolizar o OTMA. Neste primeiro momento, o não aparecimento dessa amina terciária é um fator positivo, pois apoiam os resultados até então apresentados para o pH e bases voláteis totais, cujo filé do atum encontra-se em boas condições de consumo. No entanto, não significou uma ausência durante o armazenamento do pescado.

Gráfico 3. Nitrogênio da trimetilamina em filé de atum refrigerado a  $1 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  para o tratamento grupo controle (sem revestimentos), revestimento em camadas de 0,2% carragenana e quitosana e revestimento em camadas 0,6% carragenana e quitosana.



Fonte: elaborada pelo autor (2023).

Nas colunas para o mesmo dia de análise, foram comparados os grupos; controle, camadas 0,2% e 0,6% por teste de Tukey: diferença significativa para letras minúsculas distintas,  $p < 0,05$ .

O filé de atum é pescado marinho, portanto, o oxido de trimetilamina encontra-se no músculo deste pescado, pois esse composto é biologicamente necessário, visto que os peixes marinhos habitam ambiente com elevada quantidade de sais quando comparado ao interior do seu corpo. Gonçalves (2021) menciona que OTMA, em peixe marinho, tem a função *in vivo* no músculo de auxilia o equilíbrio osmótico em frente ao ambiente hipertônico. Na presente pesquisa, o aparecimento do N-TMA ocorreu a partir do quinto dia para o grupo controle, mas não foi encontrado para os grupos de camadas intercaladas de carragenana e quitosana. Sendo assim, as camadas intercaladas têm um efeito de retarda a reação metabólica do OTMA em N-TMA, a partir do quinto dia útil de armazenamento no filé do atum refrigerado.

Logo, a ausência do N-TMA no quinto dia para os revestimentos intercalados de carragenana e quitosana foi um efeito positivo para a atividade antimicrobiana das bactérias que produzem o N-TMA, Segundo Gram e Dalgaard (2002) alguns bactérias utilizam o OTMA em anaeróbica condição para formação do N-TMA, entre quais são capazes de produzir aminas terciárias, sendo quatro espécies citadas pelos autores; *Aeromonas* spp, *P. phosphoreum*, *Shewanella*

*putrefaciens* e *Vibrio* spp. Essas bactérias pertencem as Gram-negativas, o que corrobora com os dados apresentado por Jääskeläinen *et al.* (2023) em filé de truta arco-íris, com elevada quantidade do N-TMA a partir de bactérias Gram-negativas.

No presente estudo não houve uma análise específica para essas espécies de bactérias citados anteriormente, sendo um indicativo que os polímeros estudados na presente pesquisa controlam o crescimento durante o armazenamento do filé de atum até o vigésimo dia.

No vigésimo dia, o grupo controle apresentou 9,49 mg de N/ 100 g do músculo do N-TMA, enquanto os revestimentos intercalados apresentaram 5,94 e 5,2 mg respectivamente nas concentrações de 0,2 e 0,6%. Segundo Talab e Abou-Tabeb (2021) a carragenana e quitosana de forma isolada são capazes de controlar o crescimento do N-TMA, observando valores crescentes em filés de *Cyprinus carpio*, semelhança com o presente estudo, além disso, a quitosana foi o polímero com maior potencial na redução da amina terciária, seguida da carragenana, em frente a hidrocoloides estudos na concentração de 0,5%.

Os revestimentos intercalados reduziram os valores de N-TMA, contudo existir um limite específico de acordo com a Legislação Brasileira, Regulamento de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (BRASIL, 2017), estabelecendo valores máximo para o nitrogênio da trimetilamina de 4 mg de N/100g do músculo do pescado. Essa limitação é necessária, pois segundo Castro *et al.* (2018), o N-TMA é um composto orgânico incolor, higroscópico e inflamável, com um odor de peixe em padrões aceitável, entretanto em elevada concentração tem um sendo forte odor amoníaco.

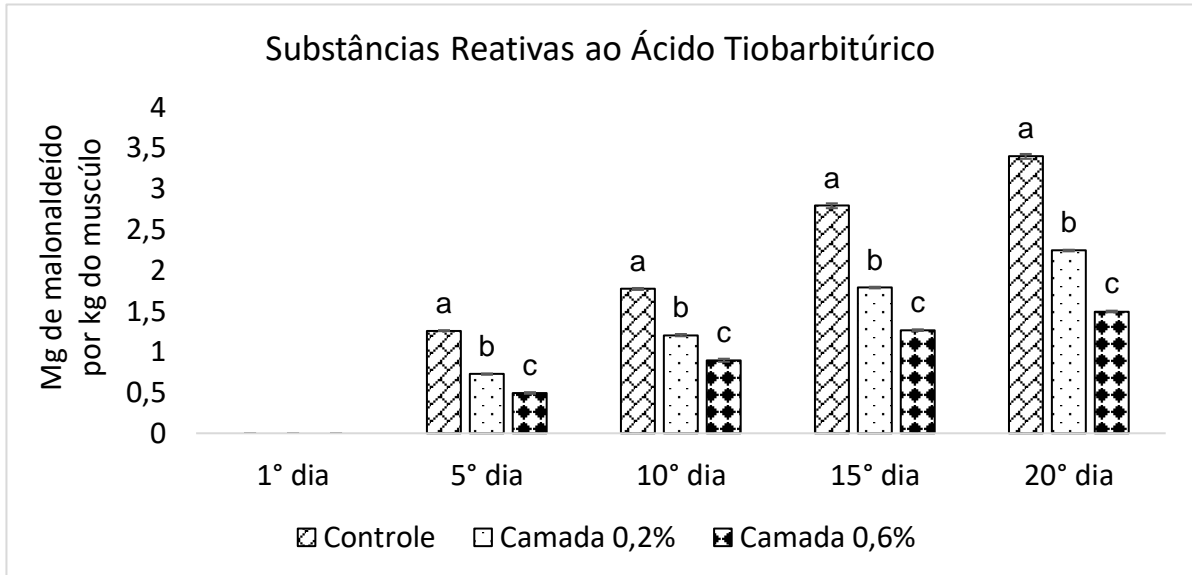
Portanto, na presente pesquisa, os revestimentos intercalados elevam a aceitação do pescado até o décimo quinto dia, mas ficando impróprio para o consumo a partir do vigésimo dia. Contudo, no décimo quinto dia, as diferenças concentrações não divergem na redução dessa amina terciária, desse modo, tanto a concentração 0,2 e 0,6% são importantes na redução do N-TMA.

#### **5.4.4 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico**

O lipídeo presente no pescado sofre o processo de oxidação durante o armazenamento, segundo Gardia *et al.* (2020) a oxidação gera diversos aldeídos secundários, entre os quais estão o malonaldeído (MDA), propanal, hexanal, acroleína e 4-hidroxinonenal (4-HNE). Um modo de identificar o malonaldeído é por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB), sendo o método mais comum para medição da oxidação lipídica através da reação do MDA com ácido tiobarbitúrico (TBA) para produzir um composto dimérico de cor rosa (GHANI *et al.* 2017). Autores ainda afirmam igual importância tem sido a busca por alternativa de inibir a oxidação lipídica através do uso de antioxidantes.

Na presente pesquisa de acordo com o GRÁFICO 4 os valores do MDA estão ausentes para todos os tratamentos no primeiro dia, contudo, o efeito antioxidante das camadas intercaladas começou a prevalecer a partir do quinto dia, tendo o grupo controle com valor de 1,25 mg de MDA/ kg do pescado, enquanto o revestimento na concentração 0,2% foi de 0,74 mg de MDA/ kg do pescado e revestimento na concentração de 0,6% foi de 0,49 mg de MDA/ kg do pescado, com diferença significativa ( $p < 0,5$ ) despontando o potencial antioxidante já confirmando *in vitro* no presente estudo.

Gráfico 4. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em filé de atum refrigerado a  $1 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  para o tratamento grupo controle (sem revestimentos), revestimento em camadas de 0,2% carragenana e quitosana e revestimento em camadas 0,6% carragenana e quitosana.



Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Nas colunas para o mesmo dia de análise, foram comparados os grupos; controle, camadas 0,2% e 0,6% por teste de Tukey: diferença significativa para letras minúsculas distintas,  $p < 0,05$ .

Jha *et al.* (2021) afirmaram que o aumento no nível de MDA é devido à formação dos radicais livres ( $\text{OH}^*$ ) que causam o dano da biomembrana lipídica principalmente aos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), formando hidroperóxido e consequentemente a formação do MDA. Autores ainda confirmaram que a diminuição do nível do MDA foi ocasionada por meio da redução dos radicais livres ( $\text{OH}^*$ ), consequentemente um menor dano à biomembrana, além disso, a diminuição na quantidade de metabólitos tóxicos. Por isto, é importante o controle da oxidação primária em gorduras, já que irá gerar produtos hidroperóxidos sem odor e comprometer o sabor do pescado (RATHOD *et al.* 2021). Logo, é importância aplicar os revestimentos intercalados com atividade antioxidante.

Os revestimentos intercalados da carragenana com a quitosana, no décimo quinto dia, continuam consistentes quando comparando ao grupo controle no armazenamento do atum. Zang *et al.* (2020), observaram que os tratamentos de imersão da carragenana (1,5, 3, 4,5%) mostraram boa capacidade de manutenção do lipídio C22:6n3 poli-insaturado (DHA), provavelmente devido à sua boa eliminação de radicais livres, resultando em uma maior estabilidade do lipídio insaturado em *Scomber japonicus* durante o congelamento. Além disso, os autores

afirmaram que ácidos graxos (AGs) poli-insaturados são especialmente propensos à oxidação e/ou degradação lipídica, sendo um processo bastante complexo, cujo AGs insaturados reagem com o oxigênio molecular por meio de cadeias de radicais livres que formam hidroperóxidos graxos de características não voláteis e voláteis.

A carragenana extraída da *Hypnea musciformis* para concentrações (0,2 e 0,6%) pesquisada no presente estudo, de acordo com o teste *in vitro*, tem uma capacidade antioxidante, sendo observada no músculo do atum, no entanto, a quitosana (*Ucides cordatus*) apresentou uma maior atividade antioxidante de acordo com as metodologias adotadas. Uma camada de quitosana entre as camadas de carragenana, possivelmente auxiliou na redução do MDA, visto que na TABELA 2 e 3, a capacidade sequestro dos radicais livres e quelação dos íons ferrosos ( $Fe^{+2}$ ) é bem maior para quitosana quando comparado a carragenana. O sequestro dos radicais livres é uma característica de quitosana de baixo peso molecular atribuído ao seu poder de quelação aos metais ( $Fe^{+2}$ ), principalmente na presença de grupos de aminoácidos, que contêm pares de elétrons solitários que ajudam a forma complexos quitosana- $Fe^{+2}$  (FENG *et al.* 2008).

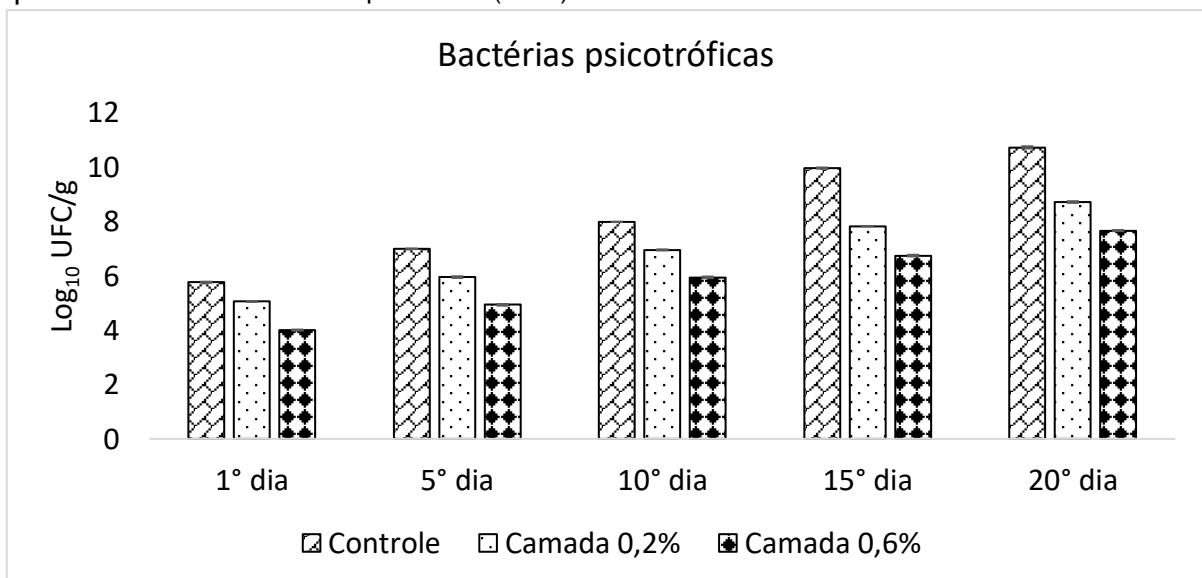
O revestimento intercalado de carragenana e quitosana mostrou-se mais efetivo na maior concentração para as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, corroborando com as análises de N-BVT e N-TMA, no vigésimo dia. De acordo com Connell (1990), os valores de MDA recomendável deve se encontrar entre 1-2 mg de MDA eq. por kg do músculo, de acordo FIGURA 8 o grupo controle e o revestimento intercalado na concentração 0,2% extrapolaram o recomendável no vigésimo dia, enquanto o valor do revestimento na concentração de 0,6% está adequado para consumo. No ponto de vista em geral, analisando as outras variáveis da presente pesquisa, no décimo quinto dia, o revestimento na concentração 0,2% está apta ao consumo de acordo legislação brasileira, apesar da qualidade inferior do pescado. Portanto, os revestimentos intercalados de carragenana e quitosana são ótimas estratégias para a conservação dos lipídeos em filé de atum.

## 5.5 Análises microbiológicas para o tempo de prateleira

### 5.5.1 Bactérias psicotróficas

As bactérias psicotróficas têm recebido atenção em várias investigações durante os últimos anos, principalmente para aplicação em novas tecnologias no beneficiamento do pescado, visto que a tecnologia pode retardar a multiplicação dessas bactérias, proporcionando condições mais favoráveis na preservação do pescado (TAWAB *et al.* 2019). No GRÁFICO 5 foi possível observar uma redução das bactérias psicotróficas no primeiro dia, para os revestimentos intercalados de carragenana e quitosana em relação ao grupo controle a  $1 \pm 0,3^\circ\text{C}$ . Os microrganismos de baixa temperatura referem-se àqueles que podem se multiplicar em temperaturas abaixo de  $5^\circ\text{C}$ , como é o caso das bactérias psicotróficas (WEI *et al.* 2019).

Gráfico 5. Bactérias psicotróficas em filé de atum refrigerado a  $1 \pm 0,3^\circ\text{C}$  para o tratamento grupo controle (sem revestimentos), revestimento em camadas de 0,2% carragenana e quitosana e revestimento em camadas 0,6% carragenana e quitosana. Fonte: elaborada pelo autor (2023).



A temperatura é uma variável que controla o crescimento das bactérias psicotróficas, apesar disso, o crescimento é inevitável durante o armazenamento, segundo Cavicchioli (2006) as bactérias psicotróficas contêm uma grande quantidade de ácidos graxos insaturados de cadeia linear e ramificada, no qual o ponto de fusão dos lipídios é reduzido, tornando as membranas celulares em boa

fluidez em baixas temperaturas, dessa forma, contribuir na multiplicação dessas bactérias. Dessa maneira, a aplicação dos revestimentos intercalados de carragenana e quitosana é uma técnica que auxilia no emprego da refrigeração, visto que a redução da temperatura controlar o crescimento das bactérias psicrotróficas, no entanto, devido as suas características biológicas as bactérias conseguem crescer em baixa temperatura, porém, os polímeros proporcionam ação de antimicrobiana ao se aplicar os revestimentos melhorando a qualidade do pescado.

Ação antimicrobiana dos revestimentos em relação ao grupo controle, persiste até o vigésimo dia, quando se comparar com as análises físico-químicas (pH, N-BVT, N-TMA) houve uma redução dessas variáveis com uma menor contagem das bactérias no músculo do pescado do atum, devido a dificuldade do crescimento das bactérias psicrotróficas mais sensíveis a atividade microbiana dos polímeros estudados. As bactérias psicrotróficas pertencem a uma grande variação de espécies de bactérias, com uma diversidade de colônias, devido ao meio de cultura utilizado para seu crescimento não ser seletivo. A variação populacional de bactérias presente no músculo do pescado propícia uma maior vulnerabilidade da degradação do filé do atum, segundo Zang *et al.* (2019c) as diferentes bactérias psicrotróficas secretam diferentes tipos de enzimas, como proteases, lipases e fosfolipases com diferentes tamanhos moleculares.

Essa informação contribuiu com os dados apresentados na presente pesquisa, uma vez que, os revestimentos intercalados podem atuar em grupos específicos de bactérias, conseqüentemente atenuando a diversidade de enzimas proteolíticas que causam a degradação das proteínas, diminuindo formação de bases voláteis totais e pH. No entanto, a contagem bacteriana para o grupo controle continua com um crescimento mais elevado, isto deve, segundo ao Ahagari *et al.* (2021) a capacidade das bactérias psicrotróficas em manter a função metabólica em baixa temperatura, especificamente das proteínas que se adaptam ao frio, tendo como estratégia reduzir a temperatura de estabilidade para sua sobrevivência, gerando uma maior flexibilidade com atividade específica melhorada. Diante disto, os revestimentos intercalados de carragenana e quitosana são eficientes na redução na contagem de microrganismos, mais uma vez, devido ação bactericida ou bacteriostático dos polímeros.

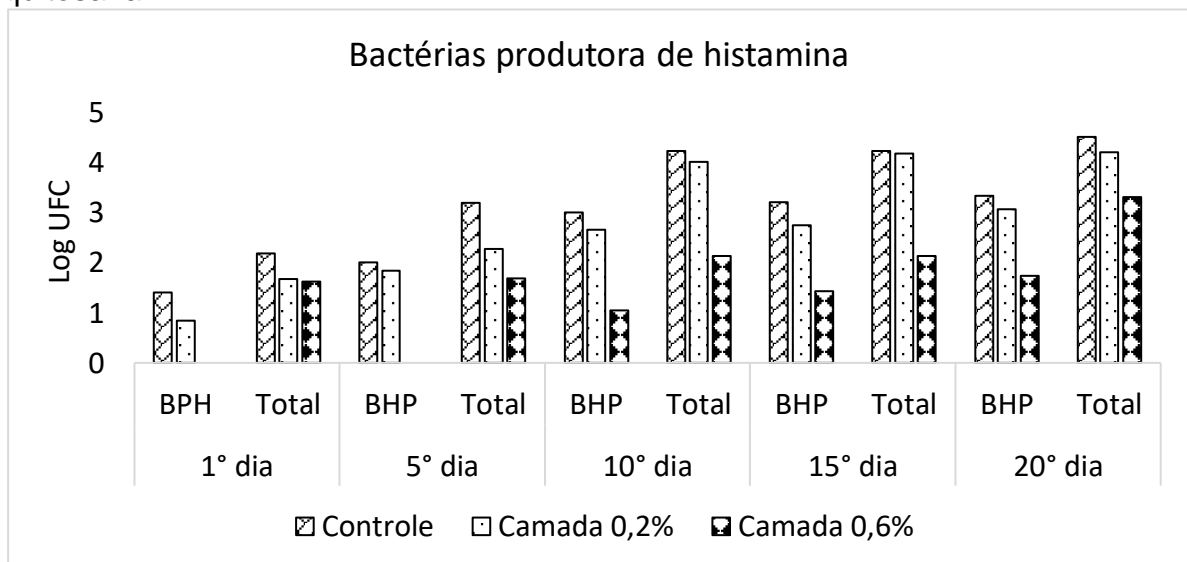


De forma geral, a interação eletrostática o grupo amino ( $\text{NH}_3^+$ ) da quitosana e grupo sulfato ( $-\text{O}_3\text{S}$ ) da carragenana favoreceu o desempenho de minimizar o crescimento de bactérias psicrotróficas no músculo do atum. A interação eletrostática entre dois componentes é um fenômeno, que fornece uma importante tecnologia com um sistema eficiente na liberação dos agentes antimicrobianos em alimentos contendo polissacarídeos aniônicos, sendo a carragenana bastante utilizada para esta finalidade (JIANG *et al.* 2021).

### 5.5.2 Bactérias produtoras de histamina

A histamina é um metabólito importante envolvido em vários processos biológicos, por exemplo, se manuseado incorretamente, pode se acumular em peixes e laticínios devido a capacidade das bactérias descarboxilar histidina para produzir histamina (DWIDAR e YOKOBAYASHI, 2019). No GRÁFICO 6, pode-se observar o efeito positivo dos revestimentos intercalados de carragenana e quitosana para as bactérias produtoras de histamina, sendo uma tecnologia importante no controle do crescimento para estes microrganismos.

Gráfico 6. Bactérias produtoras de histamina em filé de atum refrigerado a  $1 \pm 0,3^\circ\text{C}$  para o tratamento grupo controle (sem revestimentos), revestimento em camadas de 0,2% carragenana e quitosana e revestimento em camadas 0,6% carragenana e quitosana



Fonte: elaborado pelo autor (2023).

No primeiro dia, o grupo controle apresentou quantificação maior em relação ao revestimento na concentração de 0,2%. No entanto, o revestimento na concentração de 0,6% mostrou-se um resultado expressivo quando comparado aos

dois tratamentos anteriormente citados, já que não houve crescimento no primeiro dia, sendo observado o mesmo comportamento até o quinto dia.

No primeiro instaste, com a análise inicial é possível verificar um controle para essas bactérias com características típicas de produção de histamina, visto que na concentração de 0,6%, não houve coloração roxa e sem formação de halo, portanto, são bactérias que não se caracterizam como produtora de histamina. Na FIGURA 3a é possível verificar as características de tais colônias, para serem classificadas como produtora de histamina, a presença de colônias roxas e a formação do halo, além disso, na FIGURA 3b representa quando não houve o crescimento para a concentração 0,6%.

As famílias Scomberesocidae, como atum, bonito ou gaiado, são pescados que apresentam histidina livres, dessa maneira, quando a condição do congelamento é prejudicada, as bactérias presentes nas brânquias, tratos gastrointestinais ou até mesmo sobre sua própria superfície, entre as quais estão *Morganella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, apresentam atividade de histidina-descarboxilase, convertendo histidina em histamina (MARISSIAU *et al.* 2018). Além disso, depois que o composto é formado, ele é muito resistente ao cozimento, congelamento e fumaça.

Diante do exposto, para a prevenção da formação da histamina, o revestimento intercalado de carragenana e quitosana é uma estratégia eficiente na inibição dos microrganismos que formariam tal composto nos primeiros dias. Os peixes de músculos escuros, e como todos os peixes comumente implicados no envenenamento por escombrotóxina por meio do pescado, têm as características de serem peixes pelágicos de natação rápida e migratórios, compartilhando uma necessidade comum de tamponamento de ácido acumulado em seu músculo, apresentado histidina livres, por isto, sendo capaz de causar intoxicação, conhecida por intoxicação escombrotóxina de peixes (SFP) (HUNGERFORD, 2021).

A intensidade de intoxicação por histamina depende de dose ingerida no alimento e da suscetibilidade do organismo. A histamina exerce seu efeito pela ligação com os receptores nas membranas celulares ao sistema respiratório, cardiovascular, gastrointestinal e hemato/imunológico, bem como na pele (GONÇAVES, 2021). O autor ainda chama atenção para a carne escura, crua ou processada, que frequentemente apresenta uma variação de 100 a 500 mg/ 100 g de histamina, sendo possível ingerir até 180 mg de histamina sem nenhum efeito

sério, embora a sensibilidade alérgica varie de indivíduo para indivíduo. O atum é uma espécie muito utilizada no consumo *in natura*, conseqüentemente a aplicação do revestimento intercalado de carragenana e quitosana seria uma forma de prevenir o risco quando consumido cru na forma de sushi, diminuindo a proliferação de bactérias produtoras de histamina.

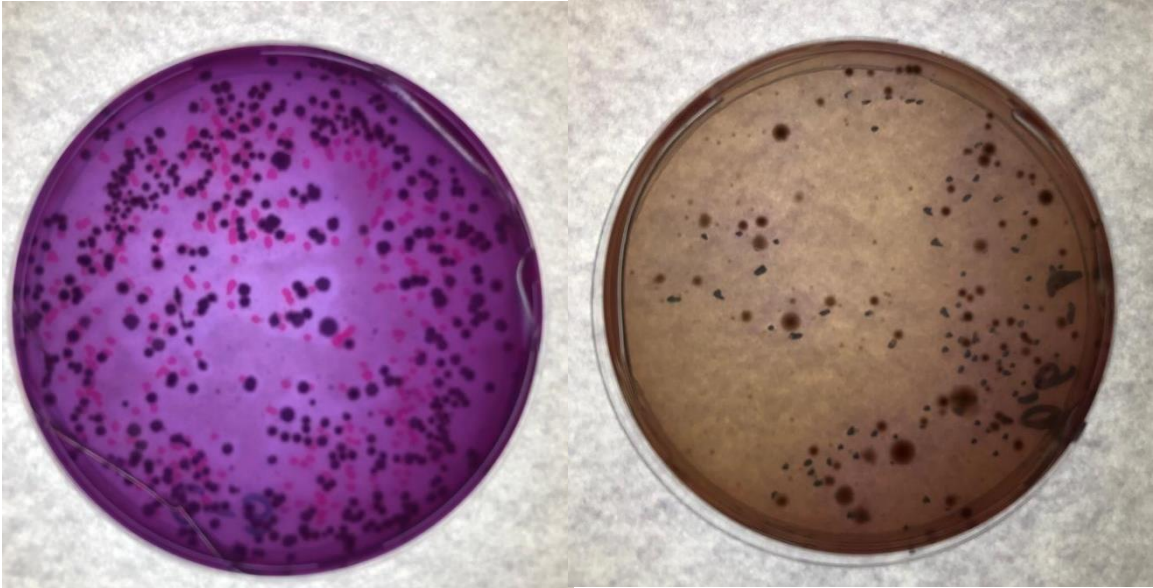
A tecnologia do revestimento intercalado de carragenana quitosana é uma estratégia viável para o músculo do atum consumido *in natura*, pois o efeito imediato no controle para as bactérias produtoras de histamina, ao aplicar-se as camadas de revestimentos, devido a ação bactericida ou bacteriostática, neste momento, já que pela contagem total são outras bactérias que estavam presentes. Conseqüentemente, a produção de histamina não está relacionada com o número total de bactérias, mas ao número de microrganismos que podem sintetizar histidina-descarboxilase.

Os polímeros de carragenana e quitosana dependo da concentração pode até prevenir o desenvolvimento inicial e/ou até mesmo reduzir a produção de bactérias produtoras de histamina como observado até vigésimo dia. Moomin e Sulistijowati (2021) afirmaram que filmes de carragenana (1 a 3%) têm efeito no músculo do atum para bactérias produtoras de histamina, enfatizando o poder antimicrobiano do polímero para as bactérias Gram-negativas, o mesmo pode ser dito na presente pesquisa em uma menor concentração, visto que o mesmo efeito foi observando. A quitosana também apresenta informação na literatura na inibição para a produção de histamina em pescado, Demircan e Ocak (2021), compravam redução na produção de histamina em filé de cavala durante o armazenamento.

Figura 3. Contagem das bactérias produtoras de histamina

(3a)

(3b)



Fonte: elaborada pelo autor (2023).

## 6 CONCLUSÃO

A interação entre as camadas de carragenana e quitosana é uma boa estratégia para utilizar as propriedades antioxidantes dos polímeros, potencializando a aplicação dos revestimentos em multicamadas no músculo do atum. Uma camada de quitosana entre as camadas de carragenana foi importante para atividade antioxidante no presente estudo, pois é polímero mais eficiente do que a carragenana, além disso, contribuição da atividade antimicrobiana de ambos os polímeros.

No ponto de vista de aplicação dos revestimentos, de modo geral, as multicamadas intercaladas foram eficientes no músculo do atum, para o pH, N-BVT, N-TMA e SRATB, reduzindo o perfil de degradação do pescado durante do primeiro ao vigésimo dia de análise. Ressaltando que o revestimento em multicamada 0,6% apresentou um menor perfil de degradação do pescado, além de melhor controle no crescimento de bactérias psicotróficas e produtora de histamina. Contudo, o revestimento em multicamadas 0,2%, de acordo com a legislação brasileira vigente, pode ser utilizado até o décimo quinto dia, apesar da qualidade inferior na proteção do filé do atum.

De acordo com os dados apresentados, os revestimentos em multicamadas intercaladas da carragenana e quitosana têm a capacidade de estender o tempo de prateleira de filé do atum refrigerado constituído a partir de polímeros biodegradáveis, não tóxico, sem causar dano ao meio ambiente e com abundância de matéria-prima, o que viabilizar aplicação dos revestimentos.

## REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, A.; NAIBAH, I. KARTIKAYANI, D.; NURILMALA, M.; YUSFIANDAYANI, R.; SONDIRA, M. F. A. Fish quality and nutritional assessment of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) during low temperature storage. **IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science**, v. 404, p. 1-11, 2019.
- ADANDE, R.; LIADY, M. N. D.; GILDAS, D.; CÉSAIRE, A. M. T.; FIOGBE, D. A review of captures and treatments of sea food, post mortem biochemical degradations of macro-molecules and impacts of certain factors on the quality of the fish. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**. n.4, v.8, p.351-359, 2020.
- AHAGARI, H.; YAZDANI, P.; EBRAHIMI, V.; SOOFIYANI, S. R.; AZARGUN, R.; TARHRIZ, V.; EYVAZI, S. An Updated review on production of food derived bioactive peptides; focus on the psychrotrophic bacterial proteases. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.35, p. 1-10, 2021.
- ALBUQUERQUE, P. B. S.; COELHO, L. C. B. B.; TEXEIRA, J. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Approaches in biotechnological applications of natural polymers. **AIMS Molecular Science**. v.3, n.3, p. 386-425, 2016
- ALIFIO, V. G.; MANZO, C.; MICILLO. From Fish Waste to Value: An Overview of the Sustainable Recovery of Omega-3 for Food Supplements. **Molecules**. v. 26, p. 1-23, 2021.
- ARULKUMAR, A.; SATHEESHKUMAR, K.; PARAMASIVAM, S.; RAMESHTHANGAM, P.; MIRANDA, J. M. Chemical Biopreservative Effects of Red Seaweed on the Shelf Life of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). **Foods**. n. 9, v. 5, p. 1-12, 2020.
- AZAZA, Y. B.; HAMDY, M.; CHARMETTE, C.; JRIDI, M.; LI, S.; NASRI, M.; NASRI, R. Development and characterization of active packaging films based on chitosan and sadinella protein isolate: Effects on the quality and the shelf life of shrimps. **Food Packaging and Shelf Life**. v.31, p. 1-11, 2022.
- AZEVEDO, A. R.; ALMEIDA, V. A.; SANTOS, S. A. S. Síntese de bioplásticos feitos com polímeros naturais: uma alternativa para a gestão ambiental. **Conhecimento & Diversidade, Niterói**, v. 9, n. 19, p.59-70, 2017.
- BAKSHI, P. S.; SELVAKUMAR, D.; KADIRVELEU, KUMAR N. S. Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 1072-1083, 2020.
- BALAJI, A. B.; PAKALAPATI, H.; KHALID, M.; WALVEKAR, R.; SIDDIQUI. Natural and synthetic biocompatible and biodegradable polymers. **Biodegradable and Biocompatible Polymer Composites**. 1ª edição, editora: Elsevier, p. 1-32, 2018.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. D. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Amsterdam, v.6, n.2, p. 71-79, 2016.

- BAPTISTA, R. C.; HORITA, C. N.; SANT'ANA, A. S. Natural products with preservative properties for enhancing the microbiological safety and extending the shelf-life of seafood: A review. **Food Research International**. v. 127, p. 1-23, 2020.
- BARON, L. F.; PAZINATTO, R.; BARON, C. P. Oxidação de lipídeos e as aplicações na nutrição e saúde de animais de produção. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**. n.1, v. 37, 2020.
- BEKHIT, A. E. D.; GITERU, S. G.; HOLMAN, B. W. B.; HOPKINS, D. L. Total volatile basic nitrogen and trimethylamine in muscle foods: Potential formation pathways and effects on human health. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**. n.4, v. 20, p. 3220-3266, 2021.
- BIN, Z.; CHUAN-DONG, F.; JUAN, G.; YANG-YANG Z. Effect of kappa-carrageenan oligosaccharides on myofibrillar protein oxidation in peeled shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during long-term frozen storage. **Food Chemistry**, v. 25, p. 254-261, 2018.
- BIZYMIS, A-P.; TZIA, C. Edible films and coatings: properties for the selection of the components, evolution through composites and nanomaterials, and safety issues. **Food Science and Nutrition**. v. 62, n. 31, 2022.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. **Nature**, London, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, Apr 1958.
- BRAGA, D. L. S. **Pesquisa e Inovações Nacionais em Engenharias, Ciências Agrárias, Exatas e da Terra**. Florianópolis, SC, Instituto Scientia, 2022.
- BOUGHATTAS, F.; FUR, B. L.; KAROUNI, R. Identification and quantification of tuna species in canned tunas with sunflower medium by means of a technique based on front face fluorescence spectroscopy (FFFS). **Food Control**, v. 101, p.17-23, 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017, **o qual dispõe sobre o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Diário Oficial da União. Brasília, 2017.
- CARDOSO, G. P.; DUTRA, M. P.; FONTES, P. R.; RAMOS, A. L. S.; GOMIDE, L. A. M.; RAMOS, E. M. Selection of a chitosan gelatin-based edible coating for color preservation of beef in retail display. **Meat Science**, v. 144, p. 85-94, 2016.
- CASTRO, B. G.; VELAME, M. S.; GARCIA, L. N. H.; MORAES, G. N.; BALDINI, E. D.; POSSEBON, F. S.; PINTO, J. P. A. N; RAGHIANTE, F.; MARTINS, O. A. Influência de agentes físicos e químicos sobre a trimetilamina e bases voláteis totais de *Oreochromis niloticus*. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. n. 3, v. 12, p. 295-302, 2018.
- CAVICCHIOLI, D. REVIEWS Cold-adapted archaea. **Nature Reviews Microbiology**. v.4, p. 331-343, 2006.

- CHEW, Y. L.; LIM, Y. Y.; OMAR, M.; KHOO, K. S. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. **LWT – Food Science and Technology, Amsterdam**, v. 41, n. 6, p. 1067-1072, 2008.
- CHI, W.; CAO, L.; SUN, G.; MENG, F.; ZANG, C.; LI, J.; WANG, L. Developing a highly pH-sensitive k-carrageenan-based intelligent film incorporating grape skin powder via a cleaner process. **Journal of cleaner Production**, v. 224, p. 118862, 2020.
- 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.
- COLLETE B. B.; NAUEN, C. E. **FAO species catalogue**. Scombrids of the world. An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos, and related species known to date. FAO Fish Synop, v.2, p. 1–137, 1983.
- CONCEIÇÃO, M. M.; CONCEIÇÃO, J. T. P.; DALMAS, F. B.; ROSINI, A. M. O plástico como vilão do meio ambiente. **Revista de Geociência**, v. 18, n. 1, p. 50-53, 2019.
- CONNELL, J. J. **Methods of assessing and selecting for quality. Control of fish quality**. Oxford, U.K: Fishing News Books. p. 122-150, 1990.
- DANTAS FILHO, J. V.; PONTES, W. P.; PONTUSCHKA, R. B.; SANTOS, A. M.; CAVILI, J. Cadeia do pescado: *Salmonella spp.* como agente contaminante. **Revista de Ciência e Saúde Animal**, v. 2, p. 48-68, 2020.
- DECKER, E. A.; WELCH B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 674-677, 1990.
- DECHER, G.; HONJ, J. D.; SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. **Thin Solid Films**, v. 210-211, p. 831-835, 1992.
- DEMIR, D.; ÖFKELI, F.; CEYLAN, S.; BÖLGEN. Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from Blue Crab and Synthesis of Chitosan Cryogel Scaffolds. **Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 131-134, 2016.
- DEMIRCAN, B.; OCAK, Ö. Ö. The effects of ethyl lauroyl arginate and lemon essential oil added edible chitosan film coating on biogenic amines formation during storage in mackerel fillets. **Journal of Food Processing and Preservation**. v. 45, n. 5, p. 1-12, 2021.
- DEY, A.; DHUMAL, C. V.; SENGUPTA, P.; KUMAR, A.; PRAMANIK, N. K.; ALAM, T. Challenges and possible solutions to mitigate the problems of single-use plastics used for packaging food items: a review. **Journal of Food Science and Technology**. v. 58, n. 9, p. 3251-3269, 2021.



DHONGADE, H. J.; CHANDEWAR, A. V. An *in-vitro* investigation of the antioxidant activity of *Phyllanthus amarus*. **International Journal of Biomedical and Advance Research**, v. 4, n. 6, p. 435-439, 2013.

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

DUAN, C.; MENG, X.; KHAN, I. H.; DAI, L.; KHAN, A.; AN, X.; ZHANG, J.; HUQ, T.; NI, Y. Chitosan as A Preservative for Fruits and Vegetables: A Review on Chemistry and Antimicrobial Properties. **Journal of Bioresources and Bioproducts**, v. 4, n. 1, p. 11-21, 2019.

DUAN, X. J.; ZHANG, W. W.; LI, X. L.; WANG, B. G. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. **Food Chemistry**, v. 95, p. 37-43, 2006.

DUARTE, A. M.; SILVA, F.; PINTO, F. R.; BARROSO, S.; GIL, M. M. Quality Assessment of Chilled and Frozen Fish - MINI Review. **Foods**. v. 9, n. 12, p. 1-26, 2020.

DWIDAR, M.; YOKOBAYASHI, Development of a histamine aptasensor for food safety monitoring. **Scientific reports**. v. 9, p. 1-7, 2019.

FANI, M. Os tipos e efeitos da rancidez oxidativa em alimentos. **Food Ingredients Brasil**. n. 29, p. 38-45, 2014.

FAO, **The state of world fisheries and aquaculture**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2018, p. 227.

FARIAS, B. S.; CADAVAL JUNIOR, T. R. S.; PINTO, L. A. A. Chitosan-functionalized nanofibers: A comprehensive review on challenges and prospects for food applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 210-220, 2019.

FARHANA, A.; HANI, N. M. Characterization of edible packaging films based on semi-refined kappa-carrageenan plasticized with glycerol and sorbitol. **Food Hydrocolloids**, v. 64, 48-58, 2017.

FENG, T.; DU, Y.; LI, J.; HU, Y.; KENNEDY, J. F. Enhancement of antioxidant activity of chitosan by irradiation. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 126-132, 2008.

FLIEGER, L.; FLIEGER, M. The [DPPH•/DPPH-H]-HPLC-DAD Method on Tracking the Antioxidant Activity of Pure Antioxidants and Goutweed (*Aegopodium podagraria* L.) Hydroalcoholic Extracts. **Molecules**. v. 24, n. 25, p. 1-17, 2020.

FREITAS, L. F. Cadeia produtiva da pesca de atum *Thunnus spp.* em Itarema, Ceará Fortaleza. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará, 2018, p. 40.

FU, J.; ZHANG, M.; LIU, L.; XIAO, L.; LI, M.; AO, Y. Layer-by-Layer eletrostatic self-assembly sílica/graphene oxide ontocarbon fiber surface for enhance interfacial strength of epoxy composites. **Materials Letters**, v. 236, p. 69-72, 2019.

GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do Pescado Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação**. Editora; Atheneu, 2<sup>a</sup> edição, p. 621, 2021.

GRAM, L.; DALGAARD, P. Fisk spoilage bactéria – problems and solutions. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, n. 3, p. 262-266, 2002.

GUPTA, V.; BISWAS, D.; ROY, S. A comprehensive review of biodegradable polymer-based films and coatings and their food packaging applications. **Materials**. n. 17, v. 15, p. 5-38, 2022.

HUANG, X.; AHN, D. U. Lipid oxidation and its implications to meat quality and human health. **Food Science and Biotechnology**. n. 28, v.5, p. 1275-1285, 2019.

HAJJI, S.; KCHAOU, H.; BKHAIRIA, I.; SALEM, R. B. S. B.; BOUFI, S.; DEBEAUFORT, F.; NASRI. Conception of active food packaging films based on crab chitosan and gelatin enriched with crustacean protein hydrolysates with improved functional and biological Properties. **Food Hydrocolloids**. v.116, p. 1-23, 2021.

HAO, R.; PAN, J.; TILAMI, S. K.; SHAH, B. R.; MRÁZ, J. Post-mortem quality changes of common carp (*Cyprinus carpio*) during chilled storage from two culture systems, **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 12, n. 102, p. 5576-5576, 2022.

HEMATYAR, N.; RUSTAD, T.; SAMPELS, S.; DALSGAARD, T. K. Relationship between lipid and protein oxidation in fish. **Aquaculture Research**. v. 50, n.5, p. 1-11, 2019.

HUNGERFORD, J. M. Review histamine and Scombrottoxins. **Toxicon**. v. 201, p. 115-126, 2021.

JÄÄSKELÄINEN, E.; SÄDE, E.; RÖNKKÖ, T.; HULMAN, J.; JOHANSSON, RIEKKOLA, M. L.; BJÖRKROTH, J. Marination increased tyramine levels in rainbow trout fillet strips packaged under modified atmosphere. **Food Microbiology**. v, 109, p. 104099, 2023.

JAYAWARDANNA, H. B. A.; AFANDIB, A.; The Usage of Chitosan from Shrimp Waste as Natural Preservative for Fish Cilok (Traditional Food in Indonesia). **Indonesian Journal of Science and Education**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2019.

JAYAKODY, M. M.; VANNIARACHCHY, M. P. G.; WIJESEKARA, I. Seaweed derived alginate, agar, and carrageenan based edible coatings and films for the food industry: a review. **Journal of Food Measurement and Characterization**. v. 16, p. 1195-1227, 2022.

JHA, R. K.; AMBAD, R.; KAMBLE, A.; LAMTURE, Y. Comparative study of malondialdehyde superoxide dismutase and glutathione peroxidase in urilithiais patients: A case control study. **Journal of Pharmaceutical Research International**. v. 33, n. 37, p. 208-213, 2021.

JIANG, J-L.; ZHANG, W-Z.; NI, W-X.; SHAO, J-I. Insight on structure-property relationships of carrageenan from marine red algal: A review. **Carbohydrate Polymers**. v. 257, p. 1-12, 2021.

KATO, K.; NINOMIYA, M.; TANAKA, K.; KOKETSU, M. Effects of functional groups and sugar composition of quercetin derivatives on their radical scavenging properties. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 1808-1814, June 2016.

KHATUA, S.; ROY, T.; ACHARYA, K. Antioxidant and free radical scavenging capacity of phenolic extract from *Russula laurocerasi*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, n. 4, p. 156-160, 2016.

KHOJAH, S. M. Bio-based Coating from Fish Gelatin, K-Carrageenan and Extract of Pomegranate Peels for Maintaining the Overall Qualities of Fish Fillet. **Journal Of Aquatic Food Product Technology**. v. 29, n. 8, p. 1-13, 2020.

KE, C. L.; DENG, F. S.; CHUANG, C. Y.; LIN, C. H. Review antimicrobial actions and applications of chitosan. **Polymers**. v. 13, n. 6, p. 1-21, 2021.

KULAWIK, P.; JAMRÓZ, E.; ÖZOUL, F. Chitosan role for shelf-life extension of seafood. **Environmental Chemistry Letters**. v. 18, p. 61-74, 2019.

KUMAR, L.; RAMAKANTH, D.; AKHILA, K.; GAIKWAD. Edible films and coatings for food packaging applications: a review. **Environmental Chemistry Letters**. V.20, p. 875-900, 2022.

KUMAR, S.; YE, F.; DOBRETSOV, S.; DUTTA, J. Chitosan nanocomposite coating for food, paints, and water treatment applications. **Applied Sciences**, v. 9, n. 12, p. 1-27, 2020.

KUSNADI.; PURGIYANTE.; KUMORO, A. C.; LEGOWO, A. M. The antioxidant and antibacterial activities of chitosan extract from white shrimp shell (*Penaeus indicus*) in the waters north of Brebes, Indonesia. **Biodiversities**. n. 3, v. 23, 2022.

LI, Q.; WEI, I.; ZHANG, J.; GU, G.; GU, Z. Significantly Enhanced antioxidant activity of chitosan through chemical modification with coumarins. **Polymer Chemistry**. v. 10, n. 12, p. 1480-1488, 2019.

LI, Z.; OLAH, A.; BAER, E. Micro- and nono-layered processing of new polymeric systems. **Processing in Polymer Science**. v. 102, p. 1-39, 2020.

LIU, J.; WANG, H.; WANG, P.; GUO, M.; JIANG, S.; LI, X.; JIANG, S. Films based on k-carrageenan incorporated with curcumin for freshness monitoring. **Food Hydrocolloids**, v. 83, 134-142, 2018.

MALLE, P.; TAO, S. H. Rapid Quantitative Determination of Trimethylamine using Steam Distillation. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 9, p. 756-760, 1987.

MARINHO-SORIANO. Historical context of commercial exploitation of seaweeds in Brazil. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, p. 665-671, 2017.

MARTINHON, P. T.; RODRIGUES, A. G.; ROCHA, A. S; SOUSA, C. Polímeros e meio ambiente: uma proposta de ensino interativo numa abordagem teórico-prática para alunos de química do ensino médio. **Scientia Naturalis**, v. 1, n. 4, p. 26-38, 2019.

MARISSIAU, L.; SCIPPO, M. L.; DAUBE, G.; DENAYER, S.; BOTTELDOORN, N.; GOBERT, S.; SCHOLTES, B.; HUYSEN, G. An awkward fishing expedition. **Acta Anaesthesiologica, Belgica**. v. 69, n. 2, p. 1-4, 2018.

MCKIM, J. M.; WILLOUGHBY SR, J. A.; BLAKEMORE, W. R.; WEINER, M. L. Clarifying the confusion between poligeenan, degraded carrageenan, and carrageenan: A review of the chemistry, nomenclature, and in vivo toxicology by the oral route. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 19, 3054-3074, 2019.

MOHEBBI, S.; NEZHAND, M. N.; ZARRINTA, P.; JAFARI, S. H.; GHOLIZADE, S. S.; SAEB, M. R.; MOZAFARI, M. Chitosan in Biomedical Engineering: A Critical Review. **Bentham Science**, v. 14, p. 93-116, 2019.

MUJUBA, M.; MORSIB, R. E.; KERCH, G.; ELSABEE, M. Z.; KAYA, M.; LABIDIG, J.; KHAWAR, K. M. Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 889-904, 2019.

NIVEN, C. F. J.; JEFFREY, M. B.; CORLETT, D. A J. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 321-322, 1981.

OLIVERA, D. A.; GASPAROTTO, L. H. S.; SIQUEIRA JR, J. R. Processing of nanomaterials in Layer-by-Layer films: Potential applications in (bio)sensing and energy storage. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 2, p. 1-17, 2019.

PAL, J.; SHUKLA, B. N.; MAURYA, A. K.; VERMA, H. O.; PANDY, G.; AMITHA. A review on role of fish in human nutrition with special emphasis to essential fatty acid. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**. v. 6, n. 2, p. 427-430, 2018.

PEREIRA, S. A. Viabilidade econômica e sustentabilidade do cultivo da macroalga *Hypnea pseudomusciformis*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, p. 69, 2019.

PERERA, K.; SHARMA, S.; PRADHAN, D.; JAISWAL, K.; JAISWAL, S. Seaweed Polysaccharide in Food Contact Materials (Active Packaging, Intelligent Packaging, Edible Films, and Coatings). **Foods**. v. 10, n. 9, p. 1-22, 2021.

PRIYADARSHI, R.; RHIM, J. W. Chitosan-based biodegradable functional films for food packaging applications. **Innovative Food Science and Emerging Technologie**. v. 62, p. 102346, 2020.

RAMLOV, F.; CARVALHO, T. J. G.; COSTA, G. B. C.; RODRIGUES, E. R. O.; BAUER, C. M.; SCHIMIDT, E. C.; KREUSCH, M. G.; MORESCO, R.; NAVARRO, B. B.; CABRAL, D. Q.; BOUZON, Z. L.; HORTA, P. A.; MARASCHIN, M. *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta) responses to gasoline short-term exposure: biochemical and cellular alterations. **Acta Botanica Brasilica**, v. 33, n. 1, p. 116-117, 2019.

RATHOD, N. B.; RANVEER, R. C.; BENJAKUL, S.; KIM, S. K.; PAGARKAR, A. U.; PATANGE, S.; OZOGUL, F. Recent developments of natural antimicrobials and antioxidants on fish and fishery food products. **COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY**. v. 20, n. 4, p. 4182-4210, 2021.

RDC Nº 225, Instrumento Normativo Nº 60, **estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos**, Ministério da saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, p. 1-17, 2019.

REZAABAD, M. K.; KHODANAZARY, A.; HOSSEINI, S. M.; Effect of Chitosan treatments and vacuum packaging on the shelf life of spangled emperor lethrinus nebulosus fillets stored in refrigerator. **Journal of Packing Technology and Research**. v. 1, p. 157-164, 2017.

REZENDE-DE-SOUZA, J. H.; SAVAY-SILVA, L. K. As Bases Nitrogenadas Voláteis Totais São Confiáveis Para Aferir O Frescor De Pescado? **Ciência e tecnologia do pescado uma análise pluralista**. 1ª edição, v. 3, p. 214, 2021.

RICHARDSON, J. J.; BJÖRMAL, M.; CARUSO, F. Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms. **Science**, v. 348, n. 6233, p. 411-424, 2015.

RODRIGUES, J. A. G.; ARAÚJO, I. W. F.; PAULA, G. A.; LIMA, T. B.; BESSA, E. F.; BENEVIDES, N. M. B. Carragenana da epífita *Hypnea musciformes* obtida do cultivo experimental de *Solieria filiformis* em Flecheiras, Estado do Ceará, Brasil. **Acta Scientiarum Technology**, v. 33, n. 2, p. 137-144, 2011.

ROHMAN, A.; WIDODO, H.; LUKITANINGSIH, E.; RAFI, M.; NURRULHIDAYAH, A. F.; WINDARSIH, A. Review on in vitro antioxidant activities of Curcuma species commonly used as herbal components in Indonesia. **Food Research**. v. 2, n. 4, p. 286-293, 2020

ROMANET, R.; SARHANE, Z.; BAHUT, F.; UHL, J.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; NIKOLANTONAKI, M.; GOUGEON, R. D. Exploring the chemical space of white wine antioxidant capacity: A combined DPPH, EPR and FT-ICR-MS study. **Food Chemistry**. v. 355, p. 1-9, 2021.

ROTHOD, N. B.; BANGAR, S. P.; ŠIMAT, V.; OZOGUL, F. Chitosan and gelatine biopolymer-based active/biodegradable packaging for the preservation of fish and fishery products. **International Journal of Food Science +Technology**. n.2, v.58, p. 854-861, 2023.

ROY, S.; RHIM, J. W. Carrageenan-based antimicrobial bionanocomposite films incorporated with ZnO nanoparticles stabilized by melanin. **Food Hydrocolloids**, v. 90, p. 500-507, 2019.

RUITER, G. A.; RUDOLPH, B. Review carrageenan biotechnology. **Trends in Food Science & Technology**. v. 8, p. 389-395, 1997.

SÁNCHEZ-PARRA, M.; LOPEZ, A.; MUÑOZ-REDONDO, J. M.; MONTENEGRO-GÓMEZ, J. C.; PÉREZ-APARECIDO, J.; PERREIRA-CARO, G.; RODRÍGUEZ-SOLANA, R.; MORENO-ROJAS, J. M.; ORDÓÑEZ-DÍAZ, J. L. Study of the influence of the fishing season and the storage temperature in the fishing vessel on the

biogenic amine and volatile profiles in fresh yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and dry-cured mojama. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 114, p. 104845, 2022.

SANTOS, E. S.; SILVA, D. M. F.; FROTA, T. C.; VALQUEZ, Y. R. G. Uso de ácidos graxos poli-insaturados durante a gestão: um estudo bibliográfico. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2018.

SATIO, H.; ISHIHARA, K.; MURASE, T. Effect of fish on the docosahexaenoic acid content of total fatty acids in the lipid of *Thunnus albacores* Yellowfin tuna. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 60, p. 962-965, 1996.

SEDAYU, B. B.; CRAN, M. J.; BIGEER, S. W. Characterization of semi-refined carrageenan-based film for primary food packaging purposes. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n.9, p. 3754-3761, 2018.

SEDAYU, B.; CRAN, M. J.; BIGGER, S. W. A review of property enhancement techniques for carrageenan-based films and coatings. **Carbohydrate Polymers**. v. 216, p. 287-302, 2019.

SHANNON, E.; ABU-GHANNAM N. Review antimicrobial derivatives of marine algae: an overview of pharmacological mechanisms and applications. **Marine drugs**. v. 14, n.4, p. 1-23, 2016.

SILVA, A. S.; SAMPAIO, A. P.; SANTOS, M. S.; SOUZA, B. W. S.; EVANGESLISTA-BARRETO, N. S. Effect of chitosan coating on contamination of fresh bovine meat sold in the open market. **Revista Ciência Agrônômica**. v. 50, n. 1, p. 38-43, 2019.

SILVA, D. M.; ALVES, J. L. S.; LOURENÇO, R. F. B. Comparison of machinery in a plastic packaging productive process. **Brazilian Journal of Development**. v. 3, n. 3, p. 11116-11132, 2020.

SIMAN FILHO, A. J.; SANFELICE, R. C. Estudo bibliográfico sobre polímeros ambientalmente sustentáveis. **Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação**, v. 3, n. 2, p. 131-148, 2018.

SOARES, N.; SILVA, P.; BARBOSA, C.; PINHEIRO, R.; VICENTE, A. A. Comparing the effects of glazing and chitosan-based coating applied on frozen salmon on its organoleptic and physicochemical characteristics over six- months storage. **Journal of Food Engineering**. v. 194, p. 79-86, 2017.

SOUSA, C. L.; LOURENÇO, L. F. H.; LEHALLE, A. L. Utilização de análise de perigos e pontos críticos para a segurança de alimentos: estudo de caso em uma indústria de pescado. **Brazilian Journal of production Engineering**. v. 6, n. 3, p. 30-41, 2020.

SOUZA, M.; VAZ, A. F. M.; COSTA, T. B.; CERQUEIRA, M. A.; CASTRO, C. M. M. D.; VICENTE, A. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Construction of a biocompatible and antioxidant Multilayer coating by layer-by-layer assembly of  $\kappa$ -carrageenan and quercetin nanoparticles. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 5, p. 1150-1060, 2018a.

- SOUZA, R. B.; FROTA, A. F.; SILVA, J.; ALVES, C.; NEUGEBAUER, A. Z.; PINTEUS, S.; RODRIGUES, J. A. G.; CORDEIRO, E. M. S.; ALMEIDA, R. R.; PEDROSA, R.; BENEVIDES, N. M. B. *In vitro* activities of kappa-carrageenan isolated from red marine alga *Hypnea musciformis*: Antimicrobial, anticancer and neuroprotective potential. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 122, p.1248-1256, 2018b.
- 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.
- TALAB, A. S.; ABOU-TALEB, M. Effect of different hydrocolloids on the quality criteria of fish fingers during frozen storage. **Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries**. v. 25, n. 5, p. 323-335, 2021.
- TAVASSOLI-KAFRANI, E.; SHEKARCHIZADEH, H.; MASOUDPOUR-BEHABADI, M. Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. **Carbohydrate Polymers**. v. 137, p. 360-374, 2016.
- TAWAB, A. A. E.; EL-HOFY, F. I.; SOLIMAN, E.; NADA, S. M.; O. A. Bacteriological studies on Psychotropic bacteria and *Pseudomonas* isolated from frozen fish. **Benha Veterinary Medical Journal**. v. 37, p. 118-121, 2019.
- TENYANG, N.; TIENCHEU, B.; DJIKENG, F. T.; MORFOR, A. T. WOMENI, H. M. W. Alteration of the lipid red carp (*Cyprinus carpio*) during frozen storage. **Food Science Nutrition**, v. 7, n. 4, p. 1371-1378, 2019.
- VALE, D. A.; VIEIRA, C. B.; OLIVERIA, J. M.; VIDAL, M. F.; ALCÂNTARA, L. O.; SILVA, A. I. M.; SILVA, J. M. L.; ANDRADE, F. K.; SOUSA, J. R.; SOUZA FILHO, M. S.; SILVA, A. L. C.; SOUZA, B. W. S. Determining the wetting capacity of the chitosan coatings from *Ucides cordatus* and evaluating the shelf-life quality of *Scomberomorus brasiliensis* fillets. **Food Control**, v. 116, p. 1-9 2020.
- VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**. 1ª Edição, editora: Varela, p. 380, 2003.
- VYNCKE, W. Direct determination of the Thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 72, n. 12, p. 1084-1087, 1970.
- YANG, J.; LUO, Z.; BAN, Z.; LU, H.; LI, D.; YANG, D.; AGDAM, LI, L. The effect of the layer by layer (LBL) edible coating on strawberry quality and metabolites during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 147, p. 29-38, 2019b.
- YANG, K.; DANG, H.; LIU, I.; HU, X.; LI, X.; MA, Z.; WANG, X., REN, T. Effect of syringic acid incorporation on the physical, mechanical, structural and antibacterial properties of chitosan film for quail eggs preservation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141, p. 876-884, 2019a.

YONG, H.; LIU, J. Active packaging films and edible coating based on polyphenol-rich propolis extract: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 12, n. 2, p. 2106-2145, 2021.

YU, D.; LI, P.; XU, Y.; JIANG, Q.; XIA, W. Physicochemical, microbiological, and sensory attributes of chitosan-coated grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets stored at 4 °C. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 2, p. 390-401, 2017.

WAILAN, D. W.; SULISTIJOWAIT, R. Film Quality Of Caraginan Film Complex Of Mangrove Fruit Extract (*Sonneratia alba*) And Inhibition Of Histamine Forming Bacteria In Loin Tuna. **Jambura Fish Processing Journal**. v. 3, n. 1, p. 27-37, 2021.

WANG, T.; JÓNSDÓTTIR, R.; ÓLAFSDÓTTIR, G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. **Food Chemistry**, Oxford, v. 116, n. 1, p. 240-248, Sept 2009.

WANG, Y.; SHEN, Y.; WU, Y.; LI, C.; LI, L.; ZHAO, Y.; HU, X.; WEI, Y.; HUANG, H. Comparison of the microbial community and flavor compounds in fermented mandarin fish (*Siniperca chuatsi*): Three typical types of Chinese fermented mandarin fish products. **Food Research International**. v. 144, p. 110365, 2021.

WARSON, H. **Fundamentals of Polymer Chemistry**, Appl. Synth. Resin Latices p. 1-48, 2001.

WEI, Q.; WANG, X.; SUN, D-W.; PU, H. Rapid detection and control of psychrotrophic microorganisms in cold storage foods: A review. **Trends in Food Science & Technology**. v. 86, p. 453-464, 2019.

ZENG, J.; MATSUSAKI, M. Layer-by-layer assembly of nanofilms to control cell functions. **Polymer Chemistry**, v. 10, p. 2960-2974, 2019.

ZHANG, D.; PALMER, J.; TEH, K. H.; BIGGS, P.; FLINT, S. 16S rDNA high-throughput sequencing and MALDI-TOF MS are complementary when studying psychrotrophic bacterial diversity of raw cows' milk. **International Dairy Journal**. v. 97, p. 86-91, 2019c.

ZHANG, Z.; XIA, G.; YANG, Q.; FAN, X.; LYU. Effects of chitosan-based coatings on storage quality of Chinese shrimp. **Food Science & Nutrition**. v. 7, n.12, p. 4085-4094, 2019b.

ZHANG, X.; XU, Y.; ZANG, X.; WU, H.; SHEN, J.; CHEN, R.; XIONG, Y.; LI, J.; GUO, S. Progress on the layer-by-layer assembly of multilayered polymer composites: Strategy, structural control and application. **Progress in Polymer Science**, v. 89, p. 76-107, 2019a.

ZHANG, B.; YAN, H. B.; SU, L. J.; CHEN, X. N. Kappa-carrageenan oligosaccharides retard the progression of protein and lipid oxidation in mackerel (*Scomber japonicus*) fillets during frozen storage. **RSC Advances**. v. 10, p. 20827-20836, 2020.



**APÊNDICE A – RESULTADO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) E TESTE DE TUKEY PARA COMPOSTOS PUROS DO CONTROLE POSITIVO PARA AS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE.**

**Capacidade de sequestro do radical DPPH do controle positivo (ácido ascórbico).**

Concentração (µg/mL)	DPPH (%)
	Ácido ascórbico
50	6,764 <sup>a</sup> ± 1,152
100	11,776 <sup>b</sup> ± 1,099
250	51,831 <sup>c</sup> ± 2,460
500	94,796 <sup>d</sup> ± 1,373
1.000	96,220 <sup>d</sup> ± 0,455
1.500	96,156 <sup>d</sup> ± 0,883
2.000	96,025 <sup>d</sup> ± 0,821
2.500	96,783 <sup>d</sup> ± 0,737

Fonte: elaborada pelo autor (2023).

Concentrações comparadas pela análise de variância e teste de Tukey: letras minúsculas iguais,  $p > 0,05$ ; letras minúsculas diferentes,  $p < 0,05$ .

**Poder de quelação de íons ferrosos (FIC) do controle positivo (EDTA).**

Concentração (µg/mL)	FIC (%)
	EDTA
50	64,328 <sup>a</sup> ± 2,890
100	99,452 <sup>b</sup> ± 0,954
250	101,696 <sup>b</sup> ± 0,095
500	100,453 <sup>b</sup> ± 0,699
1.000	100,673 <sup>b</sup> ± 0,243
1.500	100,712 <sup>b</sup> ± 0,569
2.000	101,372 <sup>b</sup> ± 0,329
2.500	101,696 <sup>b</sup> ± 0,739

Fonte: elaborada pelo autor (2023).

Concentrações comparadas pela análise de variância e teste de Tukey: letras minúsculas iguais,  $p > 0,05$ ; letras minúsculas diferentes,  $p < 0,05$ .

**Poder de redução de íons férrico (FRAP) do controle positivo (butil hidroxianisol - BHA).**

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	FRAP (Abs 700 nm)
	BHA
50	0,224 <sup>a</sup> $\pm$ 0,004
100	0,387 <sup>b</sup> $\pm$ 0,010
250	0,782 <sup>c</sup> $\pm$ 0,017
500	1,294 <sup>d</sup> $\pm$ 0,017
1.000	1,393 <sup>de</sup> $\pm$ 0,022
1.500	1,454 <sup>f</sup> $\pm$ 0,020
2.000	1,391 <sup>e</sup> $\pm$ 0,022
2.500	1,438 <sup>f</sup> $\pm$ 0,022

Fonte: elaborada pelo autor (2023).

Concentrações comparadas pela análise de variância e teste de Tukey: letras minúsculas iguais,  $p > 0,05$ ; letras minúsculas diferentes,  $p < 0,05$

**Atividade inibitória do branqueamento do  $\beta$ -caroteno (BCB) do controle positivo (ácido ascórbico).**

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	BCB (%)
	Ácido ascórbico
50	62,060 <sup>a</sup> $\pm$ 1,040
100	69,503 <sup>b</sup> $\pm$ 2,712
250	70,588 <sup>b</sup> $\pm$ 1,548
500	77,839 <sup>c</sup> $\pm$ 1,135
1.000	82,444 <sup>d</sup> $\pm$ 1,112
1.500	84,058 <sup>d</sup> $\pm$ 0,479
2.000	82,564 <sup>d</sup> $\pm$ 0,227
2.500	83,896 <sup>d</sup> $\pm$ 0,583

Fonte: elaborada pelo autor (2023).

Concentrações comparadas pela análise de variância e teste de Tukey: letras minúsculas iguais,  $p > 0,05$ ; letras minúsculas diferentes,  $p < 0,05$ .