



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS**

**FILMES NANOCOMPÓSITOS ANTIMICROBIANOS OBTIDOS
A PARTIR DE PROTEÍNAS DE PESCADO E NANOARGILA
INCORPORADOS COM ÓLEOS ESSENCIAIS**

FABIANO DE ANDRADE FERREIRA

Prof. Dr. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ

Orientador

RIO GRANDE, RS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

FILMES NANOCOMPÓSITOS ANTIMICROBIANOS OBTIDOS
A PARTIR DE PROTEÍNAS DE PESCADO E NANOARGILA
INCORPORADOS COM ÓLEOS ESSENCIAIS

FABIANO DE ANDRADE FERREIRA

Engº de Alimentos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Prof. Dr. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ
Orientador

RIO GRANDE, RS

2014

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández pela confiança, orientação, ensinamentos e dedicação em todas as etapas deste trabalho.

Aos colegas do IFRS Câmpus Rio Grande, pelo apoio na flexibilização dos horários para que fosse possível a sequência deste trabalho.

Aos professores, técnicos e colegas que de uma forma ou de outra contribuíram para que este trabalho fosse concluído, especialmente à galera do LTA.

Aos bolsistas de iniciação científica Bruno, Bernardo, Juliana e Lauren pela ajuda na parte experimental.

À Islanda, pela amizade e favores prestados durante todo o doutorado.

À minha colega e amiga Sandriane Pizato, pelo apoio na realização da avaliação microbiológica.

Aos meus familiares e amigos, que sempre me deram apoio e acreditaram em meu potencial para enfrentar novos desafios.

À minha esposa Luciane, por todo seu apoio, incentivo, estímulo e paciência nos vários momentos que deixamos de ficar juntos devido ao tempo dedicado a este trabalho.

Também gostaria de fazer uma homenagem especial a minha mãe Zaira, que sempre foi minha fonte de inspiração e, mesmo não se encontrando mais conosco, onde ela estiver sei que deve estar olhando e guiando meus passos. Mãe, tudo o que sou hoje agradeço a ti.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
NOMENCLATURA	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Resíduos obtidos da industrialização de pescados	4
3.2. Proteínas do pescado.....	5
3.3. Concentração da proteína miofibrilar do pescado	6
3.4. Filmes biodegradáveis	7
3.5. Filmes proteicos.....	11
3.6. Filmes antimicrobianos.....	12
3.6.1. Agentes Antimicrobianos.....	13
3.6.2. Propriedades dos óleos essenciais	14
3.6.3. Óleo essencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	16
3.6.4. Óleo essencial de cravo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	16
3.6.5. Atividade antimicrobiana de filmes incorporados com óleos essenciais.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. Matéria-prima para obtenção da proteína recuperada	19
4.2. Obtenção da proteína recuperada (PR)	19
4.3. Caracterização da proteína recuperada	20
4.3.1. Composição proximal	20
4.3.2. Análise da Funcionalidade	21
4.3.2.1. Solubilidade	21
4.3.2.2. Determinação da capacidade de retenção de água (CRA).....	21
4.3.2.3. Determinação da capacidade de retenção de óleo (CRO)	22
4.3.3. Perfil eletroforético (SDS-PAGE)	22
4.4. Obtenção do filme	23
4.5. Caracterização dos filmes obtidos	26

4.5.1. Opacidade	26
4.5.2. Solubilidade em água	27
4.5.3. Propriedades mecânicas	28
4.5.4. Permeabilidade ao vapor de água	28
4.6. Verificação da atividade antimicrobiana dos filmes nanocompósitos de proteínas incorporados com óleos essenciais	29
4.7. Aplicação da solução filmogênica como revestimento em camarões branco (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	31
4.7.1. Preparo das amostras	31
4.7.2. Análises físico-químicas	31
4.7.2.1. Perda de massa	31
4.7.2.2. Firmeza	32
4.7.2.3. Cor	32
4.7.2.4. pH	32
4.7.2.5. Determinação de N-BVT (Bases Voláteis Totais)	32
4.7.2.6. Determinação de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)	33
4.7.3. Análises microbiológicas	34
4.8. Avaliação da microestrutura e das propriedades térmicas do filme	34
4.8.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	34
4.8.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	35
4.8.3. Termogravimetria (TGA)	35
4.9. Análise estatística	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1. Caracterização da Proteína Recuperada	36
5.1.1. Composição proximal	36
5.1.2. Análise da Funcionalidade	37
5.1.2.1. Solubilidade	37
5.1.2.2. Determinação da capacidade de retenção de água (CRA)	38

5.1.2.3. Determinação da capacidade de retenção de óleo (CRO)	39
5.1.3. Eletroforese	39
5.2. Obtenção e caracterização do filme	40
5.2.1. Planejamento experimental	40
5.3. Verificação da atividade antimicrobiana dos filmes incorporados com óleos essenciais	45
5.4. Aplicação da solução filmogênica como revestimento em camarões	49
5.4.1. Análises físico-químicas	50
5.4.1.1. Perda de massa	50
5.4.1.2. Cor	52
5.4.1.3. Firmeza	55
5.4.1.4. pH	57
5.4.1.5. N-BVT (Bases Voláteis Totais)	59
5.4.1.6. TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)	61
5.4.2. Análise microbiológicas	63
5.4.3. Avaliação da microestrutura e das propriedades térmicas do filme	67
5.4.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	67
5.4.3.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	68
5.4.3.3. Termogravimetria (TGA)	70
6. CONCLUSÕES	73
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação dos biopolímeros de acordo com a composição química.....	9
Figura 2: Fluxograma do processo para obtenção da Proteína recuperada	20
Figura 3: Fluxograma do processo para obtenção dos filmes nanocompósitos de proteína recuperada da corvina (<i>Micropogonias furnieri</i>).....	26
Figura 4: Fluxograma da técnica de difusão de disco.	30
Figura 5: Solubilidade da PR em função do pH.....	37
Figura 6: Capacidade de retenção de água da PR em função do pH.....	38
Figura 7: Perfil eletroforético das proteínas	39
Figura 8: Filmes nanocompósitos de proteínas de corvina selecionados.. ..	45
Figura 9: Placas inoculadas com <i>Escherichia coli</i> , contendo discos dos filmes.. ..	45
Figura 10: Placas inoculadas com <i>Staphylococcus aureus</i> contendo discos dos filmes	46
Figura 11: Placas inoculadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis, contendo discos dos filmes	46
Figura 12: Crescimento de microrganismos psicrófilos em amostras de camarões, sem e com revestimentos, durante o período de armazenamento.. ..	65
Figura 13: Micrografias das superfícies dos filmes proteicos de corvina	67
Figura 14: Termogramas de DSC dos filmes proteicos de corvina.. ..	69
Figura 15: Termogramas de TGA dos filmes proteicos de corvina.. ..	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variáveis utilizadas no planejamento fatorial fracionário.....	23
Tabela 2: Matriz do planejamento fatorial fracionário $2^{(5-1)}$, com os valores codificados e reais	24
Tabela 3: Composição proximal da PR liofilizada de corvina (<i>Micropogonias furnieri</i>).....	36
Tabela 4: Valores obtidos pelos filmes de proteína de corvina, correspondente a cada experimento, em relação às variáveis dependentes analisadas	41
Tabela 5: Experimentos selecionados correspondentes aos filmes de proteína de corvina com melhores características.	44
Tabela 6: Valores obtidos pelos filmes proteicos em relação à verificação da atividade antimicrobiana através da formação do halo de inibição.....	47
Tabela 7: Valores de perda de massa das amostras de camarões armazenadas a 4 ± 1 °C por 10 dias, utilizando tratamentos sem e com diferentes revestimentos.	50
Tabela 8: Valores dos parâmetros utilizados para análise de cor das amostras de camarões, sem e com diferentes revestimentos, armazenadas a 4 ± 1 °C por 10 dias.....	52
Tabela 9: Valores de firmeza das amostras de camarões, sem e com diferentes revestimentos, armazenadas a 4 ± 1 °C por 10 dias... ..	56
Tabela 10: Valores de pH das amostras de camarões, sem e com diferentes revestimentos, armazenadas a 4 ± 1 °C por 10 dias	57
Tabela 11: Valores de N-BVT das amostras de camarões, sem e com diferentes revestimentos, armazenadas a 4 ± 1 °C por 10	59
Tabela 12: Valores de TBARS das amostras de camarões, sem e com diferentes revestimentos, armazenadas a 4 ± 1 °C por 10 dias	61

NOMENCLATURA

AOAC - Association of Official Analytical Chemists

APHA - American Public Health Association

ASTM - American Society for Testing and Materials

CLSI - – Clinical Laboratory Standards Institute

CMS – Carne Mecanicamente Separada

CPP – Concentrado Proteico de Pescado

CRA – Capacidade de Retenção de Água

CRO – Capacidade de Retenção de Óleo

DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial

E - Elongação

G- Glicerol

ICMSF - International Commission on Microbial Specifications for Foods

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MMT – Montmorilonita

N-BVT – Bases Voláteis Totais

NMP – Número Mais Provável

O - Opacidade

OEC – Óleo Essencial de Cravo

OEO – Óleo Essencial de Orégano

pH – Potencial Hidrogeniônico

PR – Proteína Recuperada

PVA – Permeabilidade ao Vapor de Água

RIISPOA - Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

RT – Resistência à Tração

S - Solubilidade

SF – Solução Filmogênica

TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TGA - Termogravimetria

UFC – Unidade Formadora de Colônia

RESUMO

As indústrias de alimentos, entre elas a indústria pesqueira, geram uma grande quantidade de resíduos que, quando descartados de maneira inadequada, podem causar sérios problemas para o meio ambiente. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar filmes antimicrobianos nanocompósitos, de proteínas recuperadas da carne mecanicamente separada de pescado de baixo valor comercial, incorporados com óleos essenciais. Para este fim, utilizou-se proteína recuperada da corvina (*Micropogonias furnieri*), glicerol, montmorilonita e óleos essenciais de orégano e cravo. A proteína recuperada foi caracterizada quanto a sua composição proximal e funcionalidade apresentando um conteúdo proteico de 94,62% em base seca. Na obtenção dos filmes utilizou-se a técnica de *casting* onde foram realizados vários experimentos variando a composição da solução filmogênica em relação à quantidade de proteína, glicerol, nanoargila montmorilonita e óleos essenciais de orégano e de cravo. Os filmes foram caracterizados em relação à opacidade, solubilidade em água, propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água, sendo selecionados os filmes incorporados com óleos essenciais que apresentaram os melhores resultados, enfatizando-se a característica de alongação. A atividade antimicrobiana dos filmes, em relação à *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase positiva* e *Salmonella* Enteritidis, foi verificada pelo método de difusão em disco. Os filmes incorporados com óleos essenciais na concentração mínima de 1 mL foram os que desenvolveram atividade antimicrobiana em relação aos microrganismos avaliados. As soluções filmogênicas destes filmes foram utilizadas como revestimento através da técnica *dipping* para avaliar as mudanças ocorridas em camarões branco (*Litopenaeus vannamei*) crus, descascados e refrigerados a $4\pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 dias. Foram avaliadas características como perda de massa, cor, firmeza, pH, N-BVT, TBARS e crescimento microbiológico sendo que, em todos os tratamentos, onde os camarões foram revestidos com as soluções que continham óleo essencial os resultados foram melhores do que o tratamento controle onde a solução não era incorporada de óleo essencial. Neste aspecto o tratamento que continha em sua formulação 4,0 g de proteína recuperada, 1,35 g de glicerol, 0,6 g de montmorilonita, 1,0 mL de óleo essencial de orégano e 1,0 mL de óleo essencial de cravo foi o que apresentou o melhor resultado em todas as características analisadas. O filme correspondente a este tratamento também foi avaliado em relação a sua microestrutura e propriedades térmicas, onde foi verificado que a incorporação dos óleos essenciais altera a superfície do filme deixando-a mais porosa em relação ao filme sem óleos essenciais, por outro lado, a presença de óleos essenciais na estrutura do filme aumentou a estabilidade térmica do mesmo comparando com o filme sem óleos. Os resultados indicam que os filmes incorporados com óleos essenciais de orégano em uma concentração de 1% (v/v) apresentaram ação inibitória em relação aos microrganismos avaliados e que a vida útil dos camarões revestidos com soluções filmogênicas contendo óleos essenciais, em relação aos camarões sem revestimentos, aumentou de 5 para 8 dias.

Palavras-chave: pescado, filmes antimicrobianos, proteína recuperada, óleos essenciais.

ABSTRACT

The food industries, including the fishing industry, generate a lot of waste when disposed of improperly, can cause serious problems for the environment. The aim of this study was to develop and evaluate antimicrobial nanocomposite films from recovered proteins of mechanically separated fish meat of low commercial value, incorporated with essential oils meat. To this end, we used protein recovered croaker (*Micropogonias furnieri*), glycerol, montmorillonite and essential oils of oregano and clove. The recovered protein was characterized with respect to their composition and function having a protein content of 94.62% on a dry basis. To obtain the films we used the technique of casting where they performed several experiments varying the composition of the film solution for the quantity of protein, glycerol, montmorillonite nanoclay and essential oils of oregano and clove. The films were characterized with respect to opacity, water solubility, mechanical properties and permeability to water vapor, being selected films incorporated with essential oils that showed the best results, emphasizing the characteristic elongation. The antimicrobial activity of the films in relation to *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase positive* and *Salmonella* Enteritidis was verified by the disk diffusion method. Films incorporated with essential oils at the minimum concentration of 1mL were those who developed antimicrobial activity towards microorganisms evaluated. The film formation solutions of these films were used as coating by dipping technique to evaluate changes in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) raw, peeled and chilled at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ for 10 days. Characteristics such as weight loss, color, firmness, pH, TVB-N, TBARS and microbiological growth were being evaluated, in all treatments, where shrimp were coated with solutions containing essential oil were better than treatment control where the solution was not incorporated essential oil. In this respect the treatment that contained in its formulation 4.0 g of recovered protein, 1.35 g glycerol, 0.6 g montmorillonite, 1.0 mL of oregano essential oil and 1.0 mL of clove essential oil showed the best results in all traits. The film corresponding to this treatment was also evaluated for its thermal properties and microstructure, which found that the incorporation of essential oils alters the film surface making it more porous compared to the film without essential oils, on the other hand, presence of essential oils in the structure of the film increased thermal stability compared with the same film without oils. The results indicate that the films incorporated with oregano essential oils in a concentration of 1% (v / v) showed inhibitory activity towards microorganisms evaluated and that the life of shrimp coated film formation solutions containing essential oils in relation to shrimp without coatings increased from 5 to 8 days.

Keywords: fish, antimicrobial films, recovered protein, essential oils.

1. INTRODUÇÃO

Os resíduos da industrialização do pescado normalmente são utilizados para fabricação de farinha ou simplesmente descartados. O crescente aumento do volume de resíduos tem provocado sérios problemas para o meio ambiente, sendo que uma alternativa para minimizar este problema é o seu aproveitamento integral, através da recuperação de seus principais componentes, destacando-se a proteína.

Materiais ecológicos a partir de polímeros biodegradáveis têm recebido cada vez mais atenção no desenvolvimento de embalagens, com a finalidade de reduzir a poluição ambiental e problemas ecológicos causados por resíduos plásticos não biodegradáveis (NUR HANANI et al., 2013).

Entre os biopolímeros naturais mais utilizados na obtenção de filmes, estão os polissacarídeos e as proteínas, os quais apresentam algumas vantagens, por serem provenientes de fontes renováveis e capazes de formar uma matriz contínua e coesa (ZAVAREZE et al., 2012).

De um modo geral, as formulações para elaboração de filmes biodegradáveis a base de proteínas são constituídas pelos seguintes compostos: agente formador de filmes (macromoléculas), plastificante, solvente e de ajustador de pH (SOUZA, 2010). Nestes filmes também podem ser adicionados nanoargilas, como a montmorilonita, formando nanocompósitos para melhorar suas propriedades mecânicas (CORTEZ-VEGA, 2011).

Por outro lado, o aumento no número das doenças transmitidas por alimentos provenientes de microrganismos patógenos levou à intensificação das pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de embalagens com atividade antimicrobiana. Os filmes antimicrobianos são uma forma de embalagem ativa que pode aumentar a vida útil dos produtos e fornecer segurança aos consumidores. Este tipo de embalagem visa reduzir, inibir ou retardar a multiplicação de microrganismos patógenos e deteriorantes em alimentos (OJAGH et al., 2010).

Entre os agentes antimicrobianos naturais podemos destacar os óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas e medicinais, nos quais as propriedades biológicas têm sido exploradas há muitos anos e recentemente, o uso de compostos antimicrobianos naturais tem se intensificado com o propósito de serem aplicados na conservação de

alimentos, por serem mais seguros em relação aos aditivos químicos (SANTOS et al., 2010). Neste contexto, os óleos essenciais mais utilizados são o de alecrim, o de cravo, o de canela, o de orégano, o de noz-moscada, o de manjerição, entre outros (COMA, 2008).

Neste sentido, o resíduo do processamento da corvina (*Micropogonias furnieri*), composto por corvinas de tamanho fora do padrão, as quais muitas vezes são descartadas de forma inadequada, contribuem para o desequilíbrio ambiental na região de Rio Grande no RS e representa um enorme desperdício de subprodutos que podem ter alto valor agregado, o que nos motivou a estudar o aproveitamento deste resíduo na obtenção de um filme proteico nanocompósito que, incorporado com óleos essenciais, apresentasse atividade antimicrobiana.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver e avaliar filmes nanocompósitos de proteínas de pescado e nanoargila, com atividade antimicrobiana incorporando óleos essenciais.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver processos adequados para a obtenção da proteína recuperada, utilizando como matéria-prima, a corvina (*Micropogonias furnieri*) de tamanho fora do padrão;
- Avaliar as propriedades físico-químicas e funcionais da proteína recuperada;
- Desenvolver filmes a partir de solução filmogênica contendo a proteína recuperada, plastificante, nanoargilas e óleos essenciais;
- Avaliar as propriedades mecânicas, opacidade, solubilidade e a permeabilidade ao vapor de água dos filmes obtidos, selecionando os que apresentarem melhores resultados;
- Verificar a atividade antimicrobiana dos filmes selecionados na etapa anterior;
- Aplicar os filmes que apresentaram a melhor atividade antimicrobiana em um alimento para avaliar sua eficiência;
- Caracterizar propriedades físicas do filme que apresentou os melhores resultados na aplicação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Resíduos obtidos da industrialização de pescados

Resíduo é todo material descartado nas cadeias de produção e consumo que, por limitações tecnológicas ou de mercado, não apresenta valor de uso ou comercial e, quando manejado de forma inadequada, pode resultar em impactos negativos para o meio ambiente (MARTINS, 2011).

Conforme citado por FELTES et al. (2010), os resíduos gerados no beneficiamento do pescado (cabeça, vísceras, nadadeiras, cauda, coluna vertebral, barbatanas, escamas e restos de carne) podem representar mais de 50% da matéria-prima utilizada, variando conforme as espécies e o processamento.

Os resíduos do processamento do pescado, dentro da cadeia produtiva da pesca, podem ser direcionados para várias modalidades de aproveitamento: alimentos para consumo humano; alimentos para consumo animal (rações); fertilizantes ou adubos orgânicos; produtos químicos e, ainda, aproveitá-los no desenvolvimento de produtos funcionais como quitosana, carbonato de cálcio, óleos ricos em Ômega 3 e outros produtos de valor agregado (GONÇALVES, 2011).

De acordo com Vidal (2007), as formas em que os resíduos estão sendo dispostos e armazenados nas empresas de beneficiamento implicam em sua rápida degradação pela ação bacteriana, afetando sensivelmente a sua qualidade e limitando uma variedade de possibilidades de utilização para a elaboração de novos produtos.

A falta de direcionamento destes resíduos ocasiona o desperdício desta matéria-prima que possui grande potencial tecnológico para um desenvolvimento sustentável, impedindo a viabilidade destes resíduos para fins alternativos de produção (BERY et al., 2012).

A corvina (*Micropogonias furnieri*) é abundante na região sul do Brasil, geralmente é comercializada *in natura* ou industrializada para obtenção de produtos resfriados ou congelados. No entanto, apesar da grande disponibilidade desta matéria-prima, seu valor de mercado é inferior quando comparado a outras espécies regionais.

A corvina pode atingir até 70 cm de comprimento, porém é permitida a captura de exemplares com no mínimo 25 cm, sendo que este tamanho mínimo representa boa parte da captura que é rejeitada comercialmente (BONACINA; QUEIROZ, 2007).

No ano de 2011 foram desembarcadas no Rio Grande do Sul aproximadamente 33955 toneladas de pescado, sendo 6058 toneladas de corvina (*Micropogonias furnieri*), o que representou 18,85% do desembarque total (IBAMA/CEPERG, 2012).

Os resíduos da industrialização de pescado, entre eles os pescados de menor tamanho, normalmente são utilizados para fabricação de farinha ou simplesmente descartados. Uma alternativa para o aproveitamento integral dos resíduos é a recuperação de seus principais componentes, entre eles as proteínas (OETTERER et al., 2006).

3.2. Proteínas do pescado

Conforme ORDÓÑEZ et al. (2005), as proteínas musculares do pescado estão classificadas de acordo com sua solubilidade em três grupos principais: proteínas sarcoplasmáticas, miofibrilares e do estroma.

As proteínas sarcoplasmáticas são proteínas presentes no plasma celular que são solúveis em água e em soluções salinas tampões e, representam de 15 a 35 % do total de proteínas do tecido muscular. Estas proteínas consistem principalmente de enzimas, mioglobina e hemoglobina e, sua composição pode variar entre as espécies (BELITZ et al., 2004). De acordo com Gund (2005), as proteínas sarcoplasmáticas caracterizam-se por possuírem a capacidade de aderirem-se às proteínas miofibrilares impedindo a formação de gel de alta elasticidade, por terem baixa viscosidade, baixa capacidade de retenção de água e baixa capacidade para absorver sabores e corantes.

As proteínas miofibrilares são proteínas estruturais solúveis em soluções salinas elevadas. Estas proteínas representam de 65 a 75 % do total de proteínas do músculo do pescado (VENUGOPAL, 2009). A miosina e a actina, são as duas principais proteínas musculares responsáveis pela contração do músculo, sendo importantes por suas propriedades funcionais. A miosina é a proteína mais abundante, variando de 50 a 58 %, enquanto a actina representa de 15 a 20 % da proteína presente no aparelho contrátil

(VARELTZIS, 2000). A miosina é responsável por propriedades funcionais como: a gelificação, retenção de água e de emulsificação (RAGHAVAN; KRISTINSSON, 2008).

As proteínas do estroma ou tecido conjuntivo, que em média representam 3 % da proteína muscular total, consistem predominantemente de colágeno e elastina (VENUGOPAL, 2009). Estas proteínas, conforme citado por alguns pesquisadores, são insolúveis em água, soluções salinas ou alcalinas e são facilmente solubilizadas por aquecimento (OETTERER et al., 2006; CORTEZ-VEGA, 2011; ZAVAREZE, 2012; ROCHA, 2012).

3.3. Concentração da proteína miofibrilar do pescado

A tecnologia-base do processo de produção de concentrados proteicos de pescado é a concentração da sua proteína e sua deslipidificação, através da extração dos lipídios utilizando solventes orgânicos (SOUZA et al., 2010).

Os concentrados proteicos de pescado são basicamente produtos desidratados e moídos, com conteúdo médio de 75 % de proteínas, que podem apresentar ou não sabor e aroma de pescado, dependendo do método de obtenção utilizado (ORDÓÑEZ, 2005).

As características fundamentais dos concentrados proteicos são o elevado valor biológico, o baixo custo e a fácil conservação, possuindo concentrações de proteínas superiores à do músculo de pescado, grande capacidade de hidratação, além de uma alta digestibilidade, se comparado a outras proteínas, como a do ovo e a da carne bovina (VIDAL et al., 2011).

O concentrado proteico de pescado (CPP), produto da indústria pesqueira, pode ser obtido de espécies não comerciais, como também de resíduos da industrialização do pescado, sendo que a utilização da carne mecanicamente separada para obtenção de CPP só foi possível com o desenvolvimento de equipamentos capazes de recuperar as proteínas miofibrilares agregadas às espinhas (REBOUÇAS et al., 2012).

A extração e concentração das proteínas miofibrilares do músculo de pescado está baseada na eliminação das proteínas sarcoplasmáticas, de gorduras, pigmentos e

substâncias odoríferas, mediante uma série de lavagens da carne mecanicamente separada de pescado em água e soluções salinas (KUHN; SOARES, 2002).

CAMILO et al. (2010), na obtenção de concentrado proteico de pintado realizaram diferentes lavagens seguidas de centrifugação. Nesse processo utilizaram a proporção 1:4 (sólido:líquido) de amostra para solução de lavagem, homogeneizaram a solução durante 5 minutos abaixo de 10°C, e em seguida centrifugaram a mesma durante 15 minutos a 3500 rpm. Foram realizadas três lavagens sendo que para as duas primeiras utilizou-se NaHCO₃ a 0,25% e, na última solução de NaCl a 0,3%.

Concentrado proteico de resíduos da filetagem de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi elaborado por REBOUÇAS et al. (2012), após obtenção da carne mecanicamente separada. Foi realizada a desodorização com uma solução de ácido fosfórico 0,002% com agitação durante 15 minutos, sendo o excesso da solução eliminado por filtração e prensagem. O resíduo foi seco a 72°C durante 16 horas e após triturado até a obtenção de um pó de granulometria uniforme. Posteriormente foi realizada deslipidificação com etanol na proporção de 2:1 (etanol:sólido). O material final foi seco em estufa a 60°C por 2 horas.

Na concentração da proteína de corvina (*Micropogonias furnieri*), CORTEZ-VEGA et al. (2012), realizaram três ciclos de lavagens na carne mecanicamente separada, utilizando em cada ciclo uma solução de lavagem na proporção de 1:4 (solução:carne), a 7°C por 10 minutos. Foi utilizado solução de NaHCO₃ a 0,5% para a primeira e segunda lavagens e solução de NaCl a 0,3% para a última. Depois de cada ciclo de lavagem, as amostras foram centrifugadas a 7°C e o sobrenadante que continha gordura e proteínas solúveis em água foi desprezado.

As proteínas miofibrilares, têm sido concentradas e podem ser utilizadas como material formador de filmes biodegradáveis conforme diversos pesquisadores (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000; SOUZA et al., 2004, 2012; ZAVAREZE et al., 2012; LIU et al., 2014).

3.4. Filmes biodegradáveis

Os filmes plásticos são utilizados em larga escala para embalar alimentos por serem disponíveis em grandes quantidades, a baixo custo e com boas características

mecânicas e de barreira. A maior desvantagem dos materiais plásticos sintéticos é o fato de não serem biodegradáveis, e estarem envolvidos em problemas de gerenciamento de resíduos municipais. Estes exigem mais de 100 anos para degradação total, tendo em vista sua alta massa molar e hidrofobicidade, as quais dificultam a ação dos microrganismos e de suas enzimas na superfície do polímero (SOUSA, 2012).

A biodegradação consiste na degradação dos materiais poliméricos através da ação de organismos vivos. Segundo a ASTM (1999), polímeros biodegradáveis são polímeros degradáveis, nos quais a degradação resulta primariamente da ação de microrganismos, tais como bactérias, fungos e algas de ocorrência natural.

Materiais poliméricos naturais, tais como polissacarídeos (amido e celulose), proteínas e triglicerídeos (óleos vegetais), são biodegradáveis e podem, portanto, desempenhar um papel significativo para resolver os problemas ambientais provocados pelo uso de materiais poliméricos sintéticos (CORTEZ-VEGA et al., 2013).

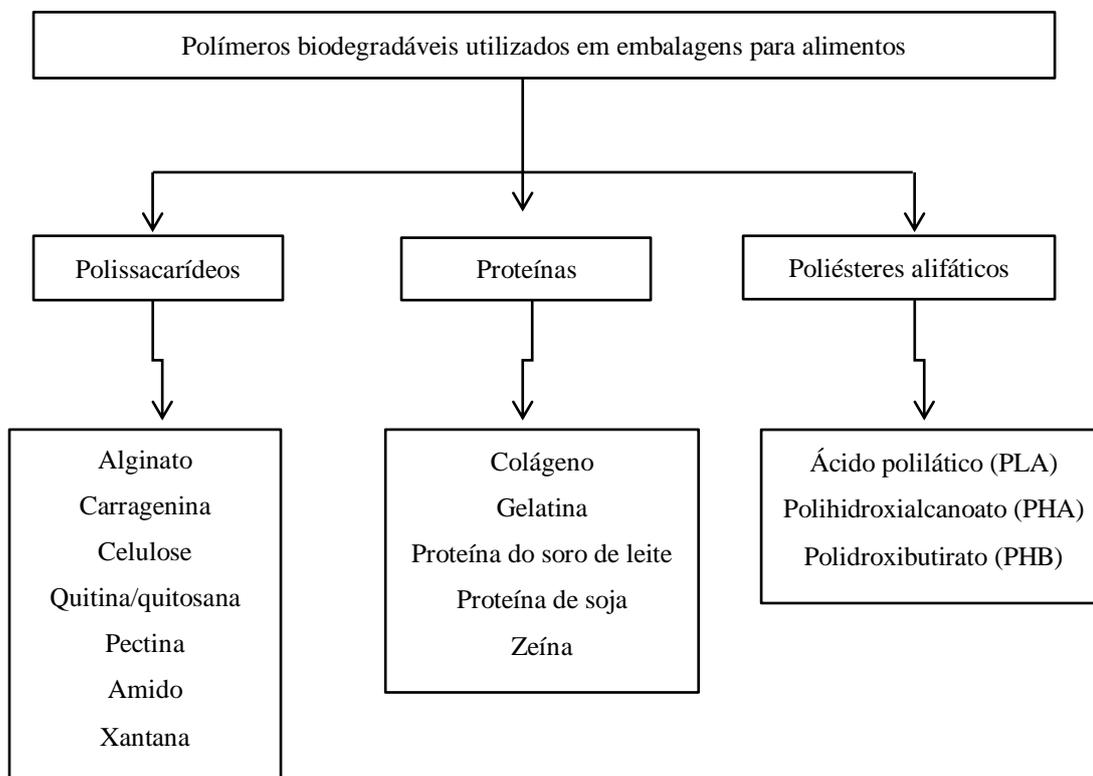
Os polímeros biodegradáveis têm oferecido aos cientistas uma solução possível para os problemas de eliminação de resíduos associados aos plásticos derivados do petróleo. Os polímeros obtidos a partir de recursos naturais podem ser melhorados através de mistura com outros compostos, quando as suas propriedades não são aceitáveis (THARANATHAN, 2003).

De acordo com PEELMAN et al. (2013), os biopolímeros são classificados de acordo com o método de produção ou sua origem em:

- Polímeros extraídos ou removidos a partir de biomassa vegetal ou animal, tais como polissacarídeos e proteínas;
- Polímeros produzidos por microrganismos, tais como polihidroxialcanoatos e celulose;
- Polímeros sintetizados quimicamente a partir de monômeros de base biológica renováveis, tais como o ácido polilático (PLA).

Na Figura 1, podemos observar os principais biopolímeros, utilizados em embalagens para alimentos, de acordo com a composição química.

Figura 1- Classificação dos biopolímeros de acordo com sua composição química



Fonte: NAIARETTI; TITA (2012)

Os filmes biodegradáveis são obtidos a partir de materiais biológicos, agindo como barreira a elementos externos, pois podem proteger os produtos embalados de danos físicos e biológicos, assim como impedir a volatilização de compostos e a perda de umidade, aumentando a vida útil do produto.

Os filmes podem ser obtidos a partir de uma solução ou dispersão do agente formador de filme, seguido da formação de uma camada fina através de técnicas, como, *casting*, extrusão, termoformagem, injeção, sopro, entre outras (GALDEANO et al., 2009).

A técnica de *casting* é amplamente utilizada em estudos de laboratório na elaboração de filmes, por não exigir equipamentos específicos e grandes quantidades de

matéria prima. Esta técnica consiste no espalhamento da solução formadora do filme (macromolécula, solvente e plastificante) em um suporte, que posteriormente é submetida à secagem para evaporação do solvente (DENAVI et al., 2009).

Para obtenção de filme biopolimérico é necessário pelo menos um polímero de alta massa molar (agente formador de filme, também denominado de macromolécula), para que seja obtida uma matriz com força de coesão e tensão. De acordo com VARGAS et al. (2008), o material deve ser adequadamente disperso e / ou dissolvido em solvente como água, álcool, soluções de ácidos diluídos, ou misturas de solventes e, em alguns casos, é necessário aquecer ou ajustar o pH da pasta com soluções alcalinas e ácidas, a fim de dissolver a macromolécula.

Conforme GALDEANO et al. (2009), a formação dos biomateriais geralmente envolve associações inter e intramoleculares ou ligações cruzadas de cadeias de polímeros. Os plastificantes aumentam o espaço livre entre as cadeias, provocando uma diminuição das forças intermoleculares ao longo da matriz, diminuindo a temperatura de transição vítrea e melhorando a flexibilidade. Em termos estruturais ocorre a formação de uma rede tridimensional semi-rígida que retém o solvente (KARBOWIAK et al., 2007).

Na prática a plastificação de um polímero consiste em adicionar os plastificantes para alterar a viscosidade do sistema, aumentando a mobilidade das macromoléculas (RABELLO, 2000). Entre os plastificantes compatíveis com a água estão a glicose, sacarose, xilol, sorbitol e glicerol que tem efeito plastificante sobre as propriedades de materiais poliméricos com alta temperatura de transição vítrea, especialmente filmes a base de biopolímeros (CHANG et al., 2006). Os plastificantes são, geralmente, adicionados na proporção de 10 a 60 g.100 g⁻¹ de matéria seca, dependendo do grau de rigidez do material (SOUSA, 2012).

Outros materiais podem ser adicionados aos filmes entre eles os nanocompósitos que são uma classe de materiais constituída por híbridos de materiais orgânicos e inorgânicos, estando à fase inorgânica dispersa, em nível nanométrico, em uma matriz polimérica orgânica (PAIVA et al., 2006).

Nos nanocompósitos a fase dispersa é constituída por argilominerais, que são filossilicatos hidratados, sendo que os filossilicatos mais freqüentemente utilizados em

nanocompósitos pertencem à família das esmectitas, como por exemplo, as montmorilonitas (MMT), hectoritas e saponitas, sendo a MMT a mais predominante delas. A adição em filmes biodegradáveis de nanoargilas como a MMT pode ser realizada para melhorar as propriedades mecânicas dos filmes (CORTEZ-VEGA, 2011).

Entre os biopolímeros naturais mais utilizados na obtenção de filmes, estão os polissacarídeos e as proteínas (ZAVAREZE et al., 2012).

3.5. Filmes proteicos

As proteínas são macromoléculas biológicas compostas por monômeros denominados de aminoácidos. Estes contêm na sua estrutura molecular pelo menos um grupo amino primário (-NH₂) e um grupo carboxílico (-COOH). Além disso, cada aminoácido tem uma cadeia lateral (R) característica que influi nas suas propriedades físico-químicas e, portanto, nas propriedades das proteínas da qual toma parte (BOBBIO; BOBBIO, 2003).

Os filmes à base de proteínas apresentam melhores propriedades de barreira aos gases e mecânicas em comparação com os filmes preparados a partir de polissacarídeos e os filmes à base de gordura, uma vez que as proteínas têm uma estrutura única, que confere uma maior gama de propriedades funcionais, em especial um elevado potencial de ligação intermolecular (CAMPOS et. al, 2011).

Conforme citado por Sousa (2012), nos filmes biodegradáveis, as proteínas interagem intermolecularmente, através da formação de ligações de hidrogênio, pontes dissulfeto e ligações hidrofóbicas formando uma rede. Esta rede, pouco hidratada, constitui então o filme, cujas propriedades são, sobretudo, em função do tipo, das atribuições e da intensidade das ligações estabelecidas.

De acordo com Plácido (2007), a formação de uma matriz macromolecular a partir de proteínas compreende três etapas:

- I. A ruptura das pontes intermoleculares de baixa energia que estabilizam o polímero em seu estado natural;
- II. O rearranjo e orientação das cadeias poliméricas e;

- III. A formação de uma matriz tridimensional estabilizada por novas interações e pontes após o agente de ruptura das pontes intermoleculares ter sido removido.

De um modo geral, as formulações para a elaboração de filmes biodegradáveis a base de proteínas são constituídas pelos seguintes compostos: agente formador de filmes (macromoléculas), plastificante, solvente e de ajustador de pH (SOUZA, 2010).

Dentre as proteínas utilizadas como agente formador de filmes, destacam-se as de origem animal, como gelatina, proteínas miofibrilares de peixe, proteínas miofibrilares de carne bovina, proteínas de soro de leite e, as de origem vegetal, como glúten, zeína e proteína de soja (PLÁCIDO, 2007).

Os filmes a base de proteínas podem ser utilizados na elaboração de embalagens ativas, que podem ser definidas como um modelo, onde o material de embalagem, o produto e a interação entre estes prolongam a vida útil ou melhoram as propriedades sensoriais, enquanto mantêm a qualidade do alimento ali acondicionado (BRAGA; PERES, 2010).

Como na maioria dos alimentos sólidos e semi-sólidos o crescimento microbiano é superficial, ocorrendo um maior contato entre o produto e o agente antimicrobiano, o desenvolvimento de embalagens ativas que apresentem atividade antimicrobiana tem se intensificado nos últimos anos (DURANGO et al., 2011)

3.6. Filmes antimicrobianos

As doenças de origem alimentar causadas por perigos microbiológicos são um grande e crescente problema de saúde pública. A maioria dos países com sistemas de notificação de casos de doenças de origem alimentar têm demonstrado aumento significativo ao longo das últimas décadas na incidência de doenças causadas por microrganismos em alimentos, como *Salmonella* spp. , *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157 entre outros (WHO, 2008).

A crescente demanda por produtos pouco processados com as mesmas garantias de inocuidade do que aqueles tratados por métodos tradicionais de conservação

incentivaram os pesquisadores a concentrar a maior parte de seus esforços em estudar novas formas de garantir a segurança alimentar e aumentar a vida útil de produtos alimentícios (FORTUNY; BELLOSO, 2003).

Os filmes antimicrobianos são uma forma de embalagem ativa que pode aumentar a vida útil dos produtos e fornecer segurança aos consumidores. Este tipo de embalagem visa reduzir, inibir ou retardar a multiplicação de microrganismos patogênicos e deteriorantes em alimentos (OJAGH et al., 2010). Neste contexto, Rocha (2012) desenvolveu filmes antimicrobianos a base de proteína de anchóia (*Engraulis anchoita*) incorporados com ácidos orgânicos.

3.6.1. Agentes Antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos alimentares são compostos utilizados para controlar a contaminação microbiana, reduzindo a taxa de crescimento ou inativando os microrganismos no alimento, mantendo a qualidade e frescor sensorial e nutricional. Tradicionalmente, o principal uso de agentes antimicrobianos em alimentos tem sido a de estender a vida útil e manter a qualidade de inativação de microrganismos deterioradores (DAVIDSON; HARRISON, 2002).

Um agente antimicrobiano é um agente químico ou biológico que destrói ou inibe o crescimento de microrganismos patogênicos. Os agentes antimicrobianos podem ser classificados como agentes químicos ou naturais (DAVIDSON; TAYLOR, 2001; DAVIDSON et al., 2005).

Entre os compostos químicos sintéticos, mais relevantes, com ação antimicrobiana estão os ácidos orgânicos e inorgânicos, tiosulfatos, antibióticos, fungicidas, sais de metais, isotiocianato e agentes quelantes. Com relação aos agentes antimicrobianos naturais podem-se citar a lactoferrina, enzimas, óleos essenciais de plantas, óleos essenciais de especiarias, quitosana, porfirinas e metais (LAGARÓN et al., 2012).

Os alimentos, por fazerem parte de nossa vida cotidiana e por utilizarem embalagens plásticas em sua forma de apresentação ao consumidor, estão recebendo atenção redobrada. Desta maneira os agentes antimicrobianos de origem natural são

alternativas eficazes e econômicas, pois são obtidos a partir das plantas aromáticas e especiarias ricas em óleos essenciais caracterizados por uma notável atividade antimicrobiana, que podem ser usados para retardar ou inibir a multiplicação microbiana quando presentes na composição de embalagens (CAMPOS et al., 2011).

3.6.2. Propriedades dos óleos essenciais

Os óleos essenciais são substâncias orgânicas voláteis muito conhecidas pelo aroma, sendo atribuída a estes óleos propriedades antivirótica, antiespasmódica, analgésica, bactericida, cicatrizante, expectorante, relaxante, vermífuga entre outras, conferindo-lhes grande emprego nas mais variadas indústrias. Conforme citado por Dias (2011), a família *Lamiaceae* compreende o maior número de espécies com óleos essenciais, além de uma grande diversidade de substâncias incluídas neste grupo de princípios ativos, sendo assim foco dos mais variados estudos. Nesta família se concentra um grande número de plantas referidas e citadas como medicinais em todo o mundo, destacando-se o manjeriço, a hortelã, a salvia, o alecrim, a menta, a erva cidreira, o orégano, o tomilho, etc.

A capacidade antioxidante, antifúngica e antimicrobiana dos óleos essenciais permite a sua utilização com alimentos, melhorando sua qualidade e beneficiando a saúde humana (HOSSAIN, 2012).

Os aspectos de caracterização química dos óleos essenciais podem ser obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, sendo que alguns óleos apresentam mais de 60 compostos diferentes, sendo que os componentes majoritários às vezes representam mais de 85% do total (GALINDO et al., 2010).

A composição e a atividade de um óleo essencial podem ser modificadas por vários aspectos, desde o modo de extração, a fatores próprios da planta e do ambiente em que ela está inserida (SILVA et al., 2012).

As propriedades biológicas dos óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas e medicinais têm sido exploradas há muitos anos e recentemente, o uso de compostos

antimicrobianos naturais tem se intensificado com o propósito de serem aplicados na conservação de alimentos, por serem mais seguros em relação aos aditivos químicos (SANTOS et al., 2011).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é devida a sua composição química, principalmente aos compostos fenólicos que exercem seus efeitos antimicrobianos diretamente na membrana citoplasmática, provocando alterações na sua estrutura e funções (HOLEY; PATEL, 2005).

Cada constituinte dos óleos essenciais possui um grau de ação antimicrobiana, sendo apresentado em ordem decrescente: timol, carvacrol, terpineol, eugenol, linalol, tujona, delta-3-careno, geranil acetato, citral, nerol, geraniol, mentona, beta-pineno, limoneno, alfa-pineno, borneol, sabineno, gama-terpineno, citronela, terpinoleno, 1,8-cineol, bornil acetato, éter metil carvacrol, mirceno, cariofileno, alfa-bisabolol, alfa-felandreno, alfa-humuleno, bocimeno, aromadendreno, para-cimeno (BUDKA; KHAN, 2010).

O carvacrol, o eugenol e o timol são compostos fenólicos que exibem ampla escala de efeitos biológicos, incluindo propriedades antioxidantes e antimicrobianas (BODINI, 2011).

De acordo com Barbosa (2010), o carvacrol e o timol possuem estrutura molecular similar, diferindo pela posição do grupo hidroxila no anel fenólico. Estas duas substâncias parecem tornar a membrana permeável, desintegrando a membrana externa, presente na parede das bactérias gram negativas, liberando lipopolissacárideos (LPS) aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática ao ATP.

A aplicação direta de um agente antimicrobiano no material da embalagem pode proporcionar vantagens, tais como uma alta concentração do agente ativo diretamente sobre a superfície do alimento, com baixa migração, e evitar o uso desta substância como um aditivo alimentar (PELISSARI et al., 2009).

Entre os óleos essenciais mais usados e, com efeito, mais eficaz estão o de cravo, orégano, alecrim, tomilho e salvia (BENAVIDES, 2012).

3.6.3. Óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*)

O orégano é um dos condimentos mais utilizados na culinária brasileira no preparo de carnes, ovos, peixes, panificação e frutos do mar. Estudos sobre o potencial antimicrobiano de especiarias mostram que o orégano apresenta resultados de destaque como agente hábil de inibição de bactérias e fungos contaminantes de alimentos (SOUZA et al., 2005).

O orégano *Origanum vulgare*, pertence à família Lamiaceae e tem sido alvo de muitas avaliações quanto às propriedades biológicas de seu óleo essencial. Em alguns óleos de orégano, o timol é o principal componente que proporciona o aroma e sabor, em outros o carvacrol é predominante. Além disso, muito têm sido explorado a respeito da composição de seu óleo essencial, devido a potencial capacidade antimicrobiana de seus componentes químicos (REHDER et. al., 2004; BUSATTA, 2006).

Em sua composição, o óleo essencial de orégano é constituído de 85% de dois componentes fenóis naturais fundamentais na ação antimicrobiana, o carvacrol e o timol, os quais agem sobre a membrana celular bacteriana impedindo sua divisão mitótica, causando desidratação nas células e, com isso, impedindo a sobrevivência de bactérias patogênicas (FUKAIAMA, 2005).

3.6.4. Óleo essencial de cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*)

A espécie vegetal *Syzygium aromaticum*, conhecida popularmente como cravo-da-Índia, pertence à família das Mirtaceae e é explorada principalmente para extração industrial do óleo essencial obtido a partir dos botões florais, folhas e outras partes. Seu fruto contém um óleo essencial de grande valor econômico no mercado, devido ao elevado teor de eugenol que é um líquido fracamente amarelado, que escurece ao ar, com aroma de cravo, e com sabor ardente e picante (ASCENÇÃO; FILHO, 2012).

O eugenol, principal constituinte químico presente na especiaria apresenta efeitos antiinflamatório, cicatrizante e analgésico. É comumente utilizado como antimicrobiano e antifúngico, com amplo espectro de ação contra *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Mycoderma* sp.

Lactobacillus acidophilus e *Bacillus cereus*, entre outras espécies de bactérias, fungos e leveduras (GUIMARÃES et al., 2008).

De acordo com AFFONSO et al. (2012), em laboratório o óleo essencial do cravo da Índia pode ser extraído por destilação simples em rotaevaporador, porém, para a produção em larga escala o processo de extração mais utilizado atualmente é a destilação por arraste a vapor. No entanto, o óleo pode também ser obtido por extração com solvente ou extração por CO₂ supercrítico.

3.6.5. Atividade antimicrobiana de filmes incorporados com óleos essenciais

Conforme citado por CAMPOS et al. (2011), existem evidências científicas em relação à eficácia de óleos essenciais como agentes antimicrobianos, quando adicionados aos filmes e formulações para revestimentos.

PELISSARI et al. (2009), avaliaram o efeito do óleo essencial de orégano variando sua concentração de 0 a 1,0% (p/v) sobre as propriedades antimicrobianas, mecânicas e de barreira quando incorporados em filmes de amido de mandioca e quitosana. As bactérias utilizadas na verificação da atividade antimicrobiana foram, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Enteritidis*.

Emiroglu (2010) utilizou óleos essenciais de orégano e/ou tomilho (1 a 5%) incorporado em filmes à base de proteína de soja e avaliou a atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus plantarum*, verificando que os óleos essenciais inibiram todos os microrganismos testados até mesmo na mínima concentração (1%).

Gomez-Estaca (2010), testou a atividade antimicrobiana de filmes comestíveis à base de gelatina e quitosana incorporados com óleos essenciais (cravo, erva-doce, tomilho e alecrim), contra bactérias patogênicas e deteriorantes (*Pseudomonas fluorescences*, *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* e *Lactobacillus acidophilus*) e observou que os filmes contendo óleo de cravo apresentaram o maior poder inibitório.

BENAVIDES et al. (2012), utilizaram óleo essencial de orégano com a concentração variando de 0 a 1,5% (p/v) em filmes de alginato para verificar o efeito sobre as propriedades físicas, mecânicas e antibacterianas do filme. Neste estudo foram avaliada a atividade antimicrobiana sobre as bactérias *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

A atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole, foi avaliada sobre as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, isolados do vôngole (*Anomalocardia brasiliiana*). Neste estudo, conforme os autores, os óleos essenciais de cravo e orégano demonstraram as melhores atividades antibacterianas e assim apresentam-se como óleos favoráveis para a aplicação em alimentos (SANTOS et al., 2011).

A *Salmonella* Enteritidis e a *Listeria monocytogenes* foram inibidos com a aplicação de óleos essenciais na superfície de pescado inteiro ou como revestimento para camarões (BURT, 2004; HAYOUNI et al., 2008).

OLIVEIRA et al. (2013), verificaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais ao testarem óleos essenciais de cravo (*Syzygium aromaticum*) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) em carne bovina moída refrigerada e inoculada com *Listeria monocytogenes*, onde foi verificado que nas amostras contendo os óleos essenciais a população de *Listeria monocytogenes* diminuiu e até mesmo não foi detectada no final do período analisado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

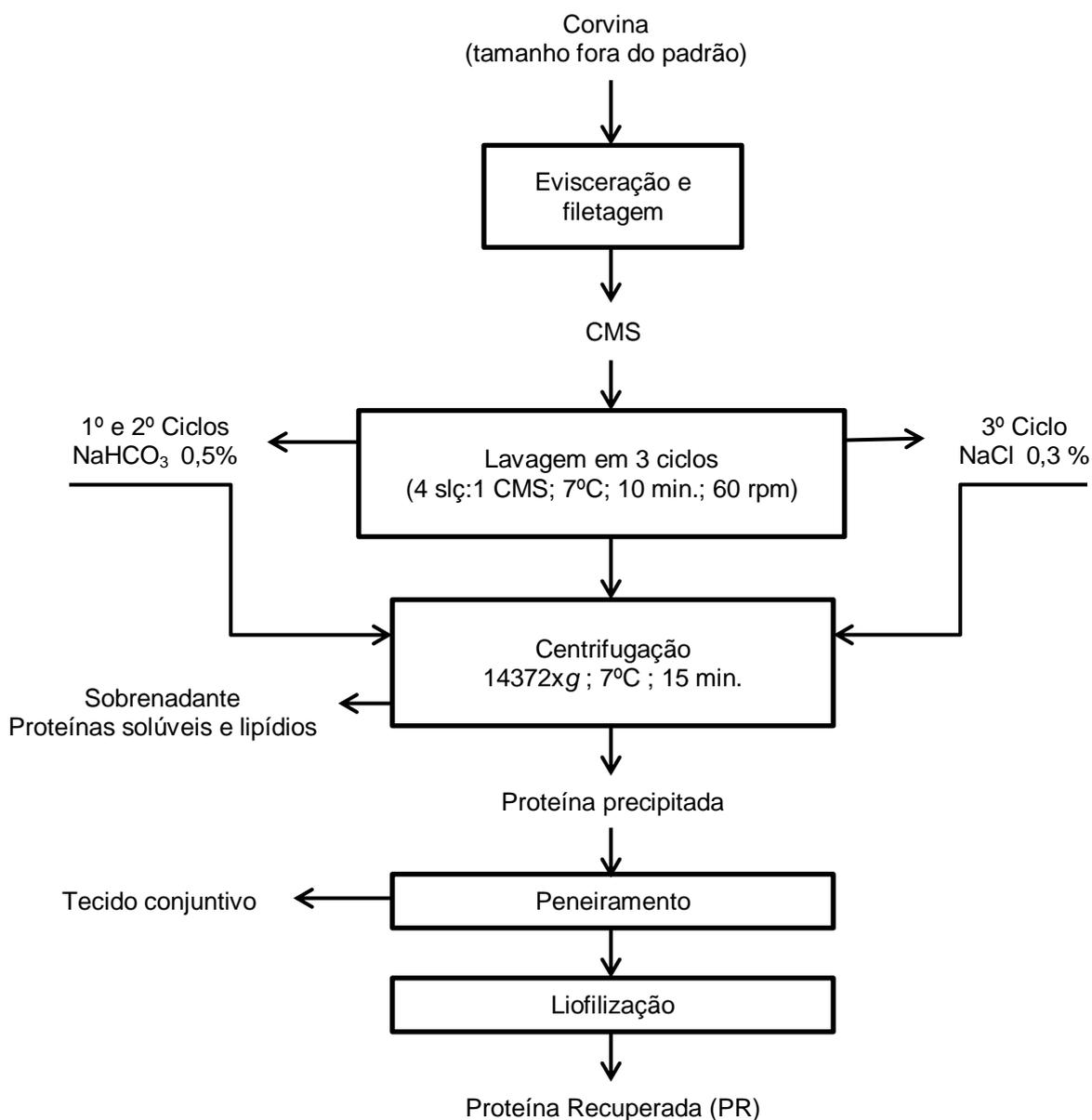
4.1. Matéria-prima para obtenção da proteína recuperada

Foi utilizada a corvina (*Micropogonias furnieri*) com tamanho fora do padrão, proveniente de indústrias de processamento de pescado da cidade do Rio Grande/RS, a qual foi transportada em caixa térmica com gelo para a Unidade de processamento de pescado vinculada ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), da Universidade Federal do Rio Grande, FURG.

4.2. Obtenção da proteína recuperada (PR)

Para obtenção da proteína adaptou-se o método utilizado por CORTEZ-VEGA et al. (2012). A carne mecanicamente separada foi obtida após evisceração e filetagem, passando por um separador de ossos e espinhas. A polpa obtida foi lavada em três ciclos, utilizando em cada ciclo de uma solução de lavagem na proporção de 4:1 (v/p), a 7°C, durante 10 minutos. Em cada ciclo de lavagem, a agitação foi mantida constante a 60 rpm utilizando um agitador mecânico. Uma solução de NaHCO₃ a 0,5% foi utilizada para a primeira e segunda lavagem e uma solução de NaCl a 0,3% foi utilizada para a última. Depois de cada ciclo de lavagem, as amostras foram centrifugadas a 7°C, a 14372xg durante 15 minutos. O sobrenadante contendo a gordura e proteína solúvel foi desprezado. A pasta final foi peneirada através de uma peneira de metal de malha de 1 mm para remover o tecido conjuntivo e então, congelada a -70°C por 24 horas em ultrafreezer (Indrel, IULT 90-D, Brasil) e posteriormente foi desidratada em liofilizador (Liotop, L108, Brasil) por 48 horas obtendo-se a proteína recuperada liofilizada utilizada como base para obtenção dos filmes.

A Figura 2 apresenta o fluxograma do processo para obtenção da proteína recuperada.

Figura 2 - Fluxograma do processo para obtenção da proteína recuperada de corvina

4.3. Caracterização da proteína recuperada

4.3.1. Composição proximal

Foi determinada a composição proximal da proteína recuperada segundo a metodologia oficial da AOAC (2000).

O conteúdo de umidade foi determinado de acordo com o método gravimétrico (nº 950.46) em estufa à 105°C; o teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl (nº 928.08) sendo o teor de proteína bruta obtido, através da multiplicação

pelo fator 6,25; o conteúdo de lipídios foi obtido pelo método de Soxhlet (nº 960.39) e cinzas, por método gravimétrico (nº 920.153) em mufla a 500-600°C. As determinações foram realizadas em triplicata.

4.3.2. Análise da Funcionalidade

4.3.2.1. Solubilidade

A solubilidade foi determinada de acordo com o método de CHALAMAIAH et al. (2010) e TADPITCHAYANGKOON et al. (2010), com variação de pH (3, 5, 7, 9 e 11). Pesou-se 0,5g de amostra em um béquer de 50 mL, adicionou-se 2 mL de NaCl 0,1 M e 48 mL de água destilada. O pH foi ajustado com HCl 1 N e NaOH 1 N (em potenciômetro de bancada ANALION, modelo PM608). A dispersão foi mantida sob agitação por 30 minutos com agitador magnético (QUIMIS, modelo 261-2), em seguida centrifugou-se a dispersão a 8667xg por 20 minutos em centrifugas de tubos (BIOSYSTEMS, modelo MPW-350R). O teor de proteína solúvel no sobrenadante foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com LOWRY et al. (1951). A solubilidade da proteína foi calculada conforme a equação 1. Para o cálculo de proteína no sobrenadante utilizou-se curva padrão de albumina.

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{\text{Quantidade de proteína no sobrenadante}}{\text{Quantidade de proteína na amostra}} \times 100 \quad (1)$$

4.3.2.2. Capacidade de retenção de água (CRA)

A capacidade de retenção de água foi determinada segundo o método de REGENSTEIN et al. (1984). Foram preparadas dispersão proteicas a 1% com variação de pH (3, 5, 7, 9 e 11). Adicionou-se à dispersão 2 mL de NaCl 0,1 M para obtenção de uma pasta homogênea, em seguida adicionou-se a solução tampão correspondente de acordo com o pH, até o volume de 40 mL, a dispersão foi mantida sob agitação por 15 minutos e centrifugados a 8667xg por 20 minutos. As proteínas solúveis no sobrenadante foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), e descontadas do total de proteína da amostra original. O sobrenadante foi descartado e os pesos úmidos foram tomados. A CRA foi dada pela diferença entre o peso da amostra úmida e o peso

da amostra seca, sendo os resultados expressos em mL de água/ g proteína, através da equação 2.

$$\text{CRA} = \frac{\text{Quantidade de água retida (mL)}}{\text{Massa original de proteína (g)}} \quad (2)$$

4.3.2.3. Capacidade de retenção de óleo (CRO)

A capacidade de retenção de óleo foi determinada de acordo com o método descrito por FONKWE; SINGH (1996). Pesou-se 0,5g de proteína que foi misturada com 10 mL de óleo de soja em tubos de centrífuga e, agitado por 10 minutos em agitador de tubos (PROENIX, Modelo AP 56). Após a mistura foi centrifugada a 8667xg por 20 minutos em centrífuga (BIOSYSTEMS, modelo MPW-350R), e a diferença entre o óleo adicionado e o óleo não retido foi considerado como a quantidade de óleo retido pelos concentrados. O resultado foi expresso como a quantidade de óleo retido (mL) por grama de proteína contida na amostra, através da equação 3.

$$\text{CRO} = \frac{\text{Óleo adicionado} - \text{Óleo não retido (mL)}}{\text{Massa de proteína (g)}} \quad (3)$$

4.3.3. Perfil eletroforético (SDS-PAGE)

A proteína recuperada foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) na concentração de 12%, de acordo com Laemli (1970). Esta análise foi realizada em uma unidade de eletroforese vertical (GSR/300STS). O gel foi obtido em um sistema tampão contínuo (tampão Tris 1,5M e SDS 10% (p/v), sendo preparado com 12% de gel de separação e 4% de gel de concentração.

As amostras foram dissolvidas em 1,5 mL de água destilada para formar uma solução contendo 0,2% de proteína. As amostras foram desnaturadas termicamente a 95°C durante 4 minutos em uma solução de β-mercaptoetanol, 0,5 M Tris (pH 6,8), glicerol, 10% de SDS (p/v) e 0,1% de azul de bromofenol (p/v). Para identificar as proteínas presentes nas amostras, foram utilizados marcadores de escalas Bio-Rad. As

bandas foram reveladas com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, Brasil).

A determinação de frações de proteínas foi realizada por massa molecular. Uma mistura de proteínas padrão (Escala graduada de Proteína BenchMark™, Califórnia, EUA), que variam em massa molecular de 10 - 220 kDa, foi utilizada.

4.4. Obtenção do filme

Para a obtenção dos filmes de proteína recuperada de corvina, após realização de testes preliminares, foi utilizada a metodologia descrita por Rodrigues e Iemma (2005). Realizou-se um planejamento experimental fracionário $2^{(5-1)}$ (16 experimentos) com 4 repetições no ponto central, sendo que também foi feito um branco com valores do ponto central, totalizando 21 experimentos.

Foram utilizados 3 níveis (-1, 0, +1) representando as variáveis codificadas e 5 variáveis independentes (reais): proteína recuperada (PR), nanoargila montmorilonita (MMT), plastificante glicerol (G), óleo essencial de orégano (OEO) e óleo essencial de cravo (OEC) no preparo da solução filmogênica (SF), que originou os filmes, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Variáveis utilizadas no planejamento fatorial fracionário

Variáveis Codificadas	Variáveis reais				
	PR (g.100 mL ⁻¹ SF)	G (g.100 mL ⁻¹ SF)	MMT (g.100 mL ⁻¹ SF)	OEO (mL.100 mL ⁻¹ SF)	OEC (mL.100 mL ⁻¹ SF)
-1	3,0	0,75	0,4	0	0
0	3,5	1,05	0,5	0,5	0,5
+1	4,0	1,35	0,6	1,0	1,0

Onde: PR= proteína recuperada; G= glicerol; MMT= montmorilonita; OEO= óleo essencial de orégano e OEC= óleo essencial de cravo.

A matriz do planejamento do tipo Fatorial Fracionário com 5 variáveis e 4 pontos centrais, mais o branco (proteína e plastificante), totalizando os 21 experimentos esta demonstrada na Tabela 2.

Tabela 2 - Matriz do planejamento fatorial fracionário $2^{(5-1)}$, com os valores codificados e reais

Experimentos	PR (g)	G (g)	MMT (g)	OEO (ml)	OEC (ml)
1	(-1) 3,0	(-1) 0,75	(-1) 0,4	(-1) 0	(+1) 1,0
2	(+1) 4,0	(-1) 0,75	(-1) 0,4	(-1) 0	(-1) 0
3	(-1) 3,0	(+1) 1,35	(-1) 0,4	(-1) 0	(-1) 0
4	(+1) 4,0	(+1) 1,35	(-1) 0,4	(-1) 0	(+1) 1,0
5	(-1) 3,0	(-1) 0,75	(+1) 0,6	(-1) 0	(-1) 0
6	(+1) 4,0	(-1) 0,75	(+1) 0,6	(-1) 0	(+1) 1,0
7	(-1) 3,0	(+1) 1,35	(+1) 0,6	(-1) 0	(+1) 1,0
8	(+1) 4,0	(+1) 1,35	(+1) 0,6	(-1) 0	(-1) 0
9	(-1) 3,0	(-1) 0,75	(-1) 0,4	(+1) 1,0	(-1) 0
10	(+1) 4,0	(-1) 0,75	(-1) 0,4	(+1) 1,0	(+1) 1,0
11	(-1) 3,0	(+1) 1,35	(-1) 0,4	(+1) 1,0	(+1) 1,0
12	(+1) 4,0	(+1) 1,35	(-1) 0,4	(+1) 1,0	(-1) 0
13	(-1) 3,0	(-1) 0,75	(+1) 0,6	(+1) 1,0	(+1) 1,0
14	(+1) 4,0	(-1) 0,75	(+1) 0,6	(+1) 1,0	(-1) 0
15	(-1) 3,0	(+1) 1,35	(+1) 0,6	(+1) 1,0	(-1) 0
16	(+1) 4,0	(+1) 1,35	(+1) 0,6	(+1) 1,0	(+1) 1,0
17	(0) 3,5	(0) 1,05	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5
18	(0) 3,5	(0) 1,05	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5
19	(0) 3,5	(0) 1,05	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5
20	(0) 3,5	(0) 1,05	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5
Branco	3,5	1,05	0	0	0

Onde: PR= proteína recuperada; G= glicerol; MMT= montmorilonita; OEO= óleo essencial de orégano e OEC= óleo essencial de cravo.

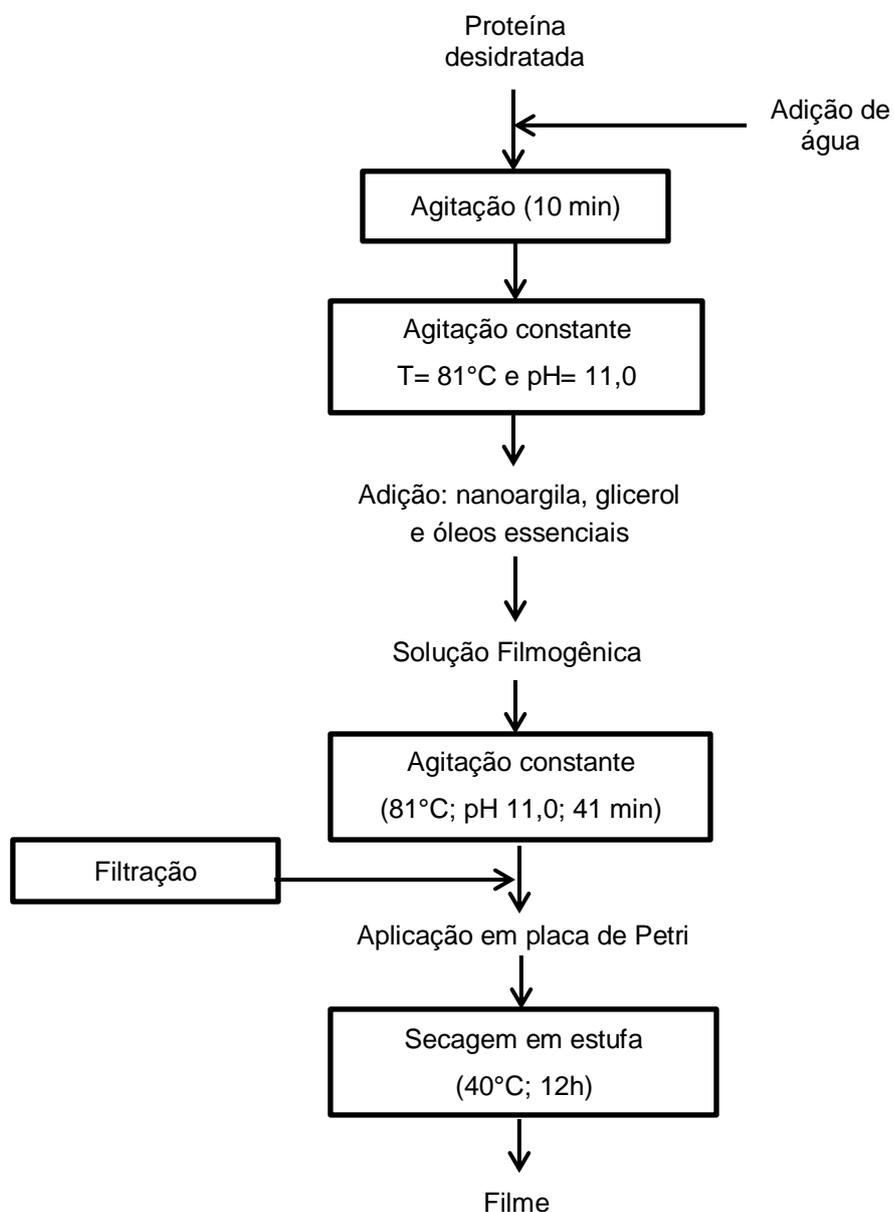
As variáveis dependentes avaliadas nos filmes obtidos foram: opacidade, solubilidade, resistência à tração, alongação na ruptura e permeabilidade ao vapor de água.

O planejamento experimental utilizado visou à obtenção do filme e não otimizar o processo. Neste sentido, foram escolhidos os filmes nanocompósitos incorporados com óleos essenciais, correspondentes aos experimentos que demonstraram melhores resultados em relação às variáveis independentes analisadas. Estes filmes foram utilizados nas demais etapas desta pesquisa.

Os filmes foram obtidos pela técnica de *casting* conforme metodologia citada por FARRO et al. (2010), sendo que inicialmente a proteína recuperada (PR) foi dispersa com 50 mL de água destilada em um béquer encamisado. A dispersão aquosa foi mantida com agitação suave e constante por 10 minutos através de um agitador eixo-hélice (IKA, modelo RW 20DZM.n), sendo a temperatura controlada em 81°C por um banho ultra-termostático (QUIMIS, modelo 214 D2), para hidratação da PR. Posteriormente à hidratação, ajustou-se o pH da dispersão para 11,0 com adição de NaOH 1N, utilizando pHmetro de bancada (MARCONI, modelo PA 200) mantendo-se agitação constante. Em seguida, foi adicionada a Montmorilonita K10 (MMT, Sigma–Aldrich), e após a completa dissolução da PR e MMT, adicionou-se o glicerol (Vetec, Química Fina) previamente solubilizado em água destilada e os óleos essenciais de cravo e orégano (Petit Marie, São Paulo, Brasil), mantendo-se o pH em 11,0 com agitação constante e a temperatura da solução filmogênica em 81°C durante 40 minutos. Na sequência, a solução filmogênica depois de filtrada foi espalhada (22,0 g) em placas de Petri, as quais foram colocadas em estufa com circulação de ar (QUIMIS, modelo 314D 242) a 40°C por 12 horas. Após a secagem, os filmes foram armazenados por 48 horas em dessecadores mantidos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $55 \pm 2\%$, controlada usando solução saturada de cloreto de cálcio, até o início das análises.

A Figura 3 representa as etapas envolvidas no processo para obtenção dos filmes de proteína recuperada de corvina.

Figura 3 - Fluxograma do processo para obtenção dos filmes nanocompósitos de proteína recuperada de corvina (*Micropogonias furnieri*).



4.5. Caracterização dos filmes obtidos

4.5.1. Opacidade

A opacidade (Y) foi determinada segundo Sobral (2000), através de colorímetro (Minolta, CR-400, Osaka, Japão). Sendo a opacidade calculada como a relação entre a

opacidade do filme sobreposto sobre o padrão preto (Y_p) e sobre o padrão branco (Y_b), segundo a equação 4.

$$Y = \frac{Y_p}{Y_b} \quad (4)$$

4.5.2. Solubilidade em água

A solubilidade em água foi determinada segundo a metodologia adaptada de GONTARD et al. (1994). Discos de cada amostra de filme, com 2 cm de diâmetro, foram previamente pesados, levados à estufa a 105°C até peso constante (matéria seca inicial) e imersos em 50 mL de água destilada.

O sistema foi mantido sob agitação, a 100 rpm, em incubadora com agitação (Cientec, CT-712RNT, São Paulo, Brasil) a 25°C por 24 horas. Após este período os discos foram retirados da água e levados novamente à estufa a 105°C até que atingissem peso constante novamente (matéria seca final).

A solubilidade do filme foi representada pelo total de matéria solúvel dissolvida em água, tendo sido calculada através da equação 5.

$$S (\%) = \frac{(m_i - m_f)}{m_f} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

S = solubilidade em água (%);

m_i = massa seca inicial da amostra (g);

m_f = massa seca final da amostra (g).

4.5.3. Propriedades mecânicas

A resistência à tração (RT) e a alongação dos filmes foram determinadas, em triplicata, segundo metodologia da ASTM (2000a), utilizando texturômetro TA.XTplus (Stable Micro Systems). As amostras foram cortadas em forma de retângulos (80 x 25 mm) e fixadas em garras com separação inicial de 50 mm e velocidade de tração de $0,8\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$.

A resistência à tração foi determinada através da equação 6.

$$RT = \frac{F_m}{A} \quad (6)$$

Onde:

RT = resistência à tração (MPa);

F_m = força máxima no momento da ruptura (N);

A = área da secção transversal do filme (m²);

A alongação foi calculada utilizando-se a equação 7.

$$E = \frac{(dr - do)}{do} \times 100 \quad (7)$$

Onde:

E = alongação (%);

do = separação inicial entre as garras (cm);

dr = separação entre as garras no momento da ruptura (cm).

4.5.4. Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada em triplicata pelo método gravimétrico da ASTM (2000b). Os filmes foram selados em células, com área de permeação de $0,13\text{m}^2$, contendo cloreto de cálcio anidro (0% UR). As células foram acondicionadas em dessecador contendo solução saturada de cloreto de sódio

(75% UR). A massa da célula foi verificada em intervalos de 24 horas, durante 7 dias. A permeabilidade ao vapor de água foi calculada através da equação 8.

$$PVA = \frac{\Delta W}{t \times A} \times \frac{L}{\Delta P} \quad (8)$$

Onde:

PVA = permeabilidade ao vapor de água (g.mm).(m².d.kPa)⁻¹;

ΔW = ganho de massa pela célula (g);

L = espessura inicial do filme (mm);

t = tempo de armazenamento (dias);

A = área do filme exposta (m²);

ΔP = diferença de pressão parcial (kPa).

4.6. Verificação da atividade antimicrobiana dos filmes nanocompósitos de proteínas incorporados com óleos essenciais

Os experimentos nos quais se obtiveram os filmes nanocompósitos de proteína de pescado e nanorgilas incorporados com óleos essenciais de orégano e cravo-da-Índia com melhores características, conforme determinadas na etapa anterior, foram selecionados e tiveram sua atividade antimicrobiana testada através da técnica de difusão de disco segundo a metodologia da CLSI (2003), adaptada para produtos naturais.

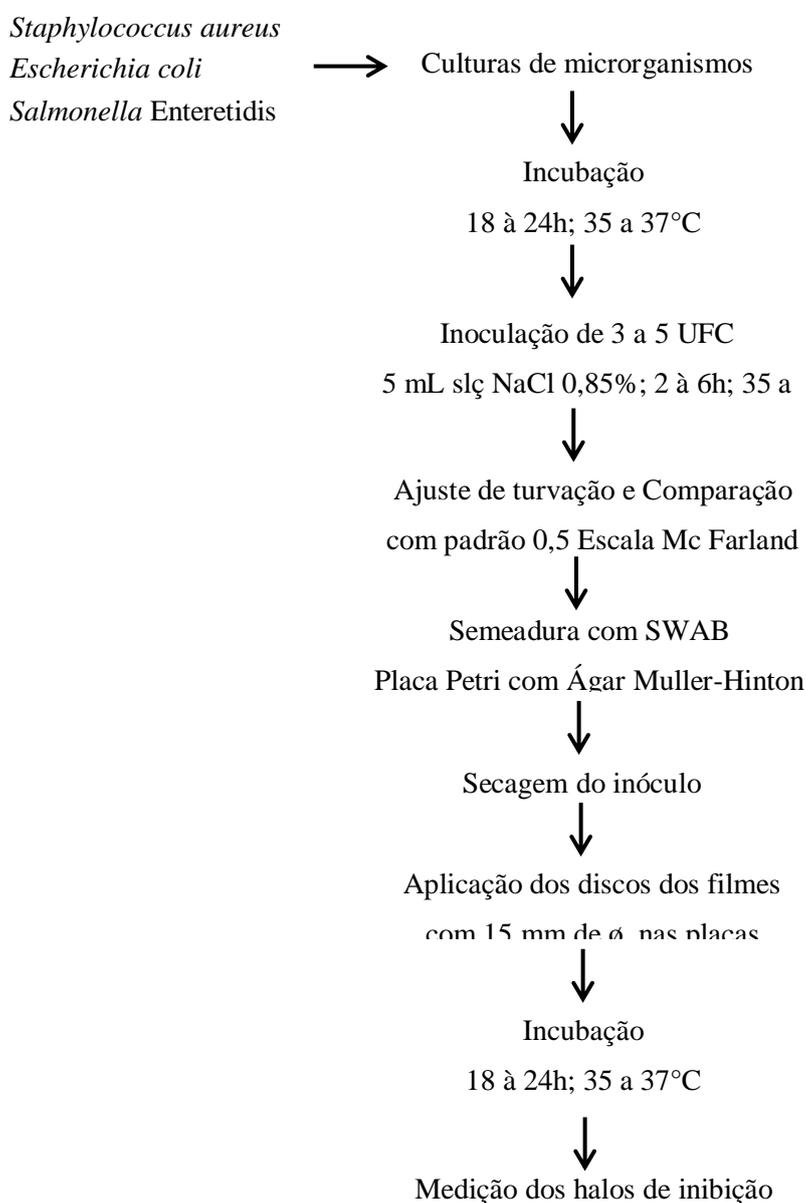
Os microrganismos utilizados na verificação da atividade antimicrobiana foram *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis, cujas cepas foram obtidas do Laboratório de Microbiologia pertencente à Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande, FURG.

De um crescimento bacteriano de 18 a 24 horas das culturas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis, foram inoculadas de três a cinco Unidades Formadoras de Colônia (UFC) em 5 mL de solução salina 0,85%, com auxílio de alça bacteriológica, previamente flambada. A suspensão obtida teve a turvação ajustada por comparação visual à suspensão padrão 0,5 da escala de McFarland. Com o auxílio de *swab* estéril, a suspensão foi semeada na superfície de uma placa de petri

contendo ágar Müller-Hinton, em três direções até a obtenção de um esfregaço uniforme. Após a secagem do inóculo, foram aplicados discos dos filmes selecionados, com 15 mm de diâmetro sobre as placas. As leituras foram realizadas, após 18 a 24 horas de incubação a 35-37°C, por meio da medição dos halos de inibição de crescimento bacteriano em milímetros de diâmetro com um paquímetro. Foi realizado um controle com o filme chamado de Branco (contendo apenas proteína recuperada e glicerol).

A Figura 4 representa as etapas da técnica de difusão de disco utilizada na verificação da atividade antimicrobiana.

Figura 4 – Fluxograma da técnica de difusão de disco



4.7. Aplicação da solução filmogênica como revestimento em camarões branco (*Litopenaeus vannamei*)

4.7.1. Preparo das amostras

A solução filmogênica foi aplicada para avaliar a vida útil de camarões branco (*Litopenaeus vannamei*) *in natura* descascados, adquiridos no mercado público municipal da cidade do Rio Grande/RS, avaliando-se a conservação, estabilidade e ação antimicrobiana. Utilizou-se nesta etapa as soluções filmogênicas referentes aos filmes obtidos pelos experimentos que apresentaram a melhor avaliação em relação à atividade antimicrobiana.

Os camarões foram transportados em caixas térmicas com gelo até a Unidade de processamento de pescado vinculada ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), da Universidade Federal do Rio Grande, FURG. Em seguida, foram higienizados com água clorada a 200 ppm por 10 minutos, lavados, drenados e divididos em partes para realização dos tratamentos. Foi realizado um tratamento controle (sem adição da solução filmogênica) e, os demais tratamentos com as soluções filmogênicas dos filmes que apresentaram melhores atividades antimicrobianas.

Para o revestimento dos camarões *in natura* foi utilizada a técnica de *dipping* citada por COSTA et al. (2012). Os camarões foram imersos diretamente na solução filmogênica correspondente por 5 minutos, e logo em seguida drenados através de peneiras e deixados em repouso por 3 minutos. Para cada tratamento, amostras de camarões revestidas com a solução filmogênica foram pesadas e acondicionadas em bandejas de PET – Politereftalato de Etileno, com tampa (SANPACK) e armazenadas refrigeradas a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 dias. Durante o período de armazenamento foram realizadas análises nos seguintes tempos: zero, 2, 4, 6, 8 e 10 dias.

4.7.2 Análises físico-químicas

4.7.2.1. Perda de massa

A perda de massa foi obtida relacionando-se a diferença entre o peso inicial do camarão e o peso obtido ao final de cada tempo de armazenamento. Os resultados foram expressos em porcentagem de perda de massa, através da equação 9.

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{(m_i - m_f)}{m_f} \times 100 \quad (9)$$

Onde:

m_i = massa inicial, no dia 0, antes de embalar as amostras;

m_f = massa final, no dia da análise, sem a embalagem.

4.7.2.2. Firmeza

As medidas de firmeza dos camarões foram determinadas utilizando-se um texturômetro (Stable Micro Systems, modelo TA.XT.plus), com ponteira cilíndrica movimentada na velocidade de 4 mm.s⁻¹ no pré-teste, 8 mm.s⁻¹ no pós-teste, e 2 mm.s⁻¹ de teste, até a profundidade de 5 mm. Os resultados foram expressos em Newton (N).

4.7.2.3. Cor

A cor dos camarões foi verificada utilizando colorímetro (Minolta, CR-400, Osaka, Japão), operando em D65 (luz do dia) e usando os parâmetros de cor CIE (L*, a*, b*), segundo PIZATO et al. (2013). Os parâmetros a*, b* e L* dos camarões foram determinados sobrepondo-se os mesmos sobre um padrão branco. Sendo que L* mede a luminosidade variando de 0 (preto) a 100 (branco). O valor de a* mede a cromaticidade da cor verde (-60) a vermelha (+60) e, o valor de b* a cromaticidade do azul (-60) a amarelo (+60).

4.7.2.4. Determinação de pH

O pH foi determinado diretamente em uma suspensão da musculatura em água destilada, medindo-se o pH com auxílio de um potenciômetro Marconi modelo PA 200 (AOAC, 2000).

4.7.2.5. Determinação de N-BVT (Bases Voláteis Totais)

As bases voláteis totais nos camarões foram determinadas conforme metodologia da AOAC (1990). Uma amostra de aproximadamente 25g foi

homogeneizada com 30 mL de TCA 7,5% durante 1 minuto em agitador, filtrada à vácuo, colocada em balão volumétrico completando-se o volume para 50 mL. Uma alíquota de 10 mL foi transferida para um tubo de destilação de microkjeldahl, adicionou-se 3 gotas de fenolftaleína 1% e submeteu-se a destilação em destilador microkjeldahl sendo o destilado recolhido em um erlemeyer contendo 5 mL de ácido bórico saturado e 4 gotas de indicador verde bromocresol + vermelho de metila (30:20). A titulação foi realizada com ácido clorídrico 0,02N. Paralelamente foi realizado um branco contendo 10 mL de TCA 7,5%. O cálculo do N-BVT (mg N/100g) foi realizado conforme a equação 10.

$$N - BVT = \frac{(V_{HCl \text{ gasto}} - V_{HCl \text{ branco}}) \times N_{\text{ácido}} \times 14,01}{P \text{ amostra}} \times 100 \quad (10)$$

Onde:

$V_{HCl \text{ gasto}}$ = Volume de HCl gasto na titulação da amostra;

$V_{HCl \text{ branco}}$ = Volume de HCl gasto na titulação do branco;

$N_{\text{ácido}}$ = Normalidade do HCl;

P = Peso da amostra em gramas.

4.7.2.6. Determinação de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)

O teste de TBARS quantifica, dentre outras substâncias, o malonaldeído, um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo.

A estabilidade dos camarões armazenados foi avaliada pela quantificação do TBARS utilizando o método descrito por CRACKEL et al. (1988). Uma amostra de aproximadamente 25g foi homogeneizada com 30 mL de Ácido Tricloroacético (TCA) a 7,5% durante 1 minuto em agitador, filtrada à vácuo, colocada em balão volumétrico completando-se o volume para 50 mL. Em um tubo de ensaio coberto com papel alumínio, foi colocado 5 mL do filtrado e 5 mL de TBA 0,02M e colocou-se em banho-maria a 80°C por 30 minutos. Paralelamente, foi realizado um branco contendo 5 mL de TCA e 5 mL de TBA em um tubo. Após os tubos foram esfriados em água

corrente e foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 538 nm. Uma curva padrão de TEP (tetraetoxipropano) foi realizada para quantificação da TBARS.

4.7.3. Análises Microbiológicas

Realizaram-se avaliações microbiológicas nos camarões revestidos para a detecção de *Staphylococcus coagulase positiva*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e Psicrófilos segundo metodologia recomendada pela APHA (2001).

4.8. Avaliação da microestrutura e das propriedades térmicas do filme

O filme nacomposito incorporado de óleos essenciais que apresentou o melhor resultado na aplicação foi avaliado para verificar as propriedades da superfície (microestrutura) e as propriedades térmicas do mesmo. As características da superfície foram realizadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e as propriedades térmicas por meio da calorimetria exploratória diferencial (DSC) e da termogravimetria (TGA). Também foi avaliado em paralelo o filme correspondente ao branco.

4.8.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises da microestrutura dos filmes foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CEMESUL) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), através das imagens de microscopia eletrônica de varredura, utilizando um microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM-6060, Japão) operado a 20 kV.

As amostras dos filmes foram colocadas em suportes de alumínio (*stubs*) e recobertas com ouro (Sputter Coater, SCDO50) para melhorar a condutibilidade. As fotografias foram tiradas com 2000x de ampliação.

4.8.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A determinação da temperatura de fusão e da variação de entalpia dos filmes foi determinada em calorímetro diferencial de varredura (Shimadzu, modelo DSC 60, Osaka, Japão), no Laboratório de Operações Unitárias, no Câmpus Cidade, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). As amostras de filmes com cerca de 6-10mg foram hermeticamente seladas em cápsulas de alumínio. A varredura foi realizada de 40 a 200°C, com uma taxa de 10°C/minuto e fluxo de nitrogênio de 50 mL/minuto.

4.8.3. Termogravimetria (TGA)

A análise termogravimétrica dos filmes foi realizada em analisador termogravimétrico (Shimadzu, modelo DTG 60, Osaka, Japão) no Laboratório de Engenharia Bioquímica, no Câmpus Cidade, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Cada amostra com cerca de 6-10mg foi aquecida em cápsulas de alumínio à uma taxa entre 30 a 500°C, com um fluxo de nitrogênio de 50 mL/minuto.

4.9. Análise estatística

As avaliações foram realizadas em triplicata, sendo os resultados apresentados pela média. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey a 5% de significância, utilizando o programa Statistica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da Proteína Recuperada

5.1.1. Composição proximal

A Tabela 3 apresenta a composição proximal da proteína recuperada (PR) liofilizada de corvina (*Micropogonias furnieri*)

Tabela 3 – Composição proximal da PR liofilizada de corvina (*Micropogonias furnieri*)

Componente	PR	
	(% b.u.)*	(% b.s)*
Umidade	8,64 ± 0,10	-
Proteínas	85,33 ± 0,12	94,62 ± 0,12
Cinzas	2,69 ± 0,09	2,98 ± 0,09
Lipídios	2,16 ± 0,12	2,40 ± 0,12

*Média de 3 repetições ± desvio padrão; b.u. = base úmida, b.s.= base seca

O elevado valor proteico encontrado na proteína recuperada neste trabalho indica que o processo de concentração da proteína utilizado foi realizado de maneira adequada, sendo uma alternativa para agregar valor aos subprodutos oriundos da indústria pesqueira.

Neste trabalho os valores obtidos para a PR (b.s.), com relação aos teores de proteínas e lipídios foram superiores e o teor de cinzas foi inferior ao encontrado por MELLO et al. (2010), que em surimi de tilápia, obtiveram valores de 92,11% para proteína, 1,70% para lipídios e de 6,18% para cinzas.

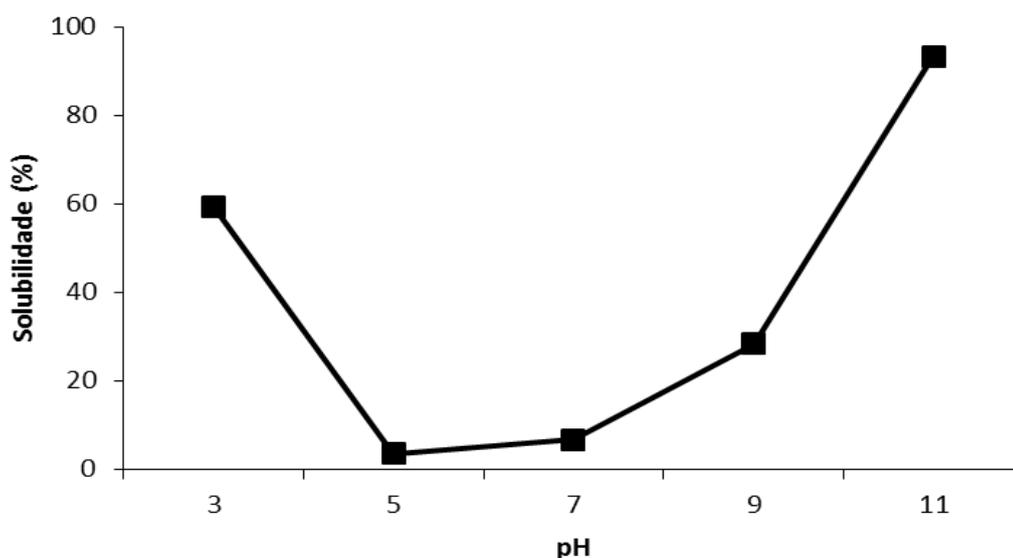
O conteúdo de proteínas neste trabalho foi superior e o de cinzas e lipídios foram semelhantes aos obtidos por CORTEZ-VEGA et al. (2012) em surimi de corvina, que foi de 91,0% de proteína, 2,9% de cinzas e 1,7% de lipídios.

5.1.2. Análise da Funcionalidade

5.1.2.1. Solubilidade

Na Figura 5 podemos verificar a solubilidade da PR em função do pH.

Figura 5 – Solubilidade da PR em função do pH



A solubilidade mais elevada foi obtida em pHs extremos, sendo que no pH 11 obteve-se o maior valor (93,24%). Por outro lado, como já era esperado, próximo ao ponto isoelétrico da proteína ocorreu uma diminuição da solubilidade. A alta solubilidade da proteína recuperada indica potenciais aplicações em alimentos formulados, proporcionando uma aparência atrativa e uma sensação agradável no produto preparado (SATHIVEL et al., 2004).

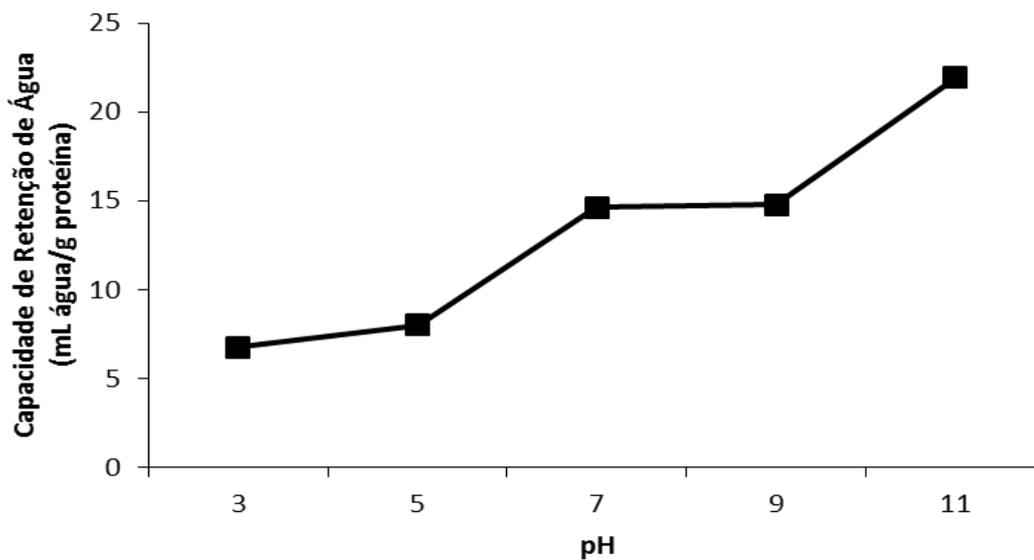
Os resultados estão de acordo com Freitas (2011), que encontrou em proteínas isoladas do músculo de corvina valores de solubilidade de 58,06% e 98,06% para pH 3,0 e pH 11,0, respectivamente.

Neste estudo foram utilizados três ciclos de lavagem para obter a PR e, de acordo com RAWDKUEN et al. (2009) e BATISTA et al. (2007), a solubilidade da proteína de surimi é maior utilizando-se três ciclos de lavagem, quando comparada com a proteína isolada pelo processo de variação de pH.

5.1.2.2. Determinação da capacidade de retenção de água (CRA)

Na Figura 6 podemos observar a capacidade de retenção de água da PR obtida em diferentes pHs.

Figura 6 – Capacidade de retenção de água da PR em função do pH



Ocorre uma menor CRA próximo ao ponto isoelétrico da proteína, devido a interações intermoleculares que diminuem a capacidade da proteína em se ligar com a água. Em pHs acima de 5,0, as moléculas de água combinam-se com os grupos polares das proteínas ocasionando um aumento da CRA (KELLEHER; HULTIN, 1999). Este fato foi verificado neste trabalho onde se observou que a CRA teve um menor aumento próximo ao ponto isoelétrico e no pH acima de 5,0 ocorreu um maior aumento, sendo que o maior valor da CRA foi no pH 11,0 (21,9 mL de água / g de proteína).

FONTANA et al. (2009), obtiveram em pH 11,0, os valores máximos de 21,9 e 22,9 mL de água / g proteína em concentrados proteicos de corvina obtidos pelo processo de solubilização ácida e alcalina, respectivamente, resultados semelhantes aos obtidos neste estudo.

5.1.2.3. Determinação da capacidade de retenção de óleo (CRO)

De acordo com FONTANA et al. (2009), a retenção de óleo varia em função do número de grupo hidrofóbicos expostos das proteínas e provavelmente, as cadeias não polares das proteínas possuem afinidade com as cadeias hidrofóbicas da molécula de óleo, contribuindo para absorção do óleo. Tal fato pode ter ocorrido neste estudo, onde os valores encontrados para a CRO foram de $3,17 \pm 0,11$ (mL óleo / g proteína).

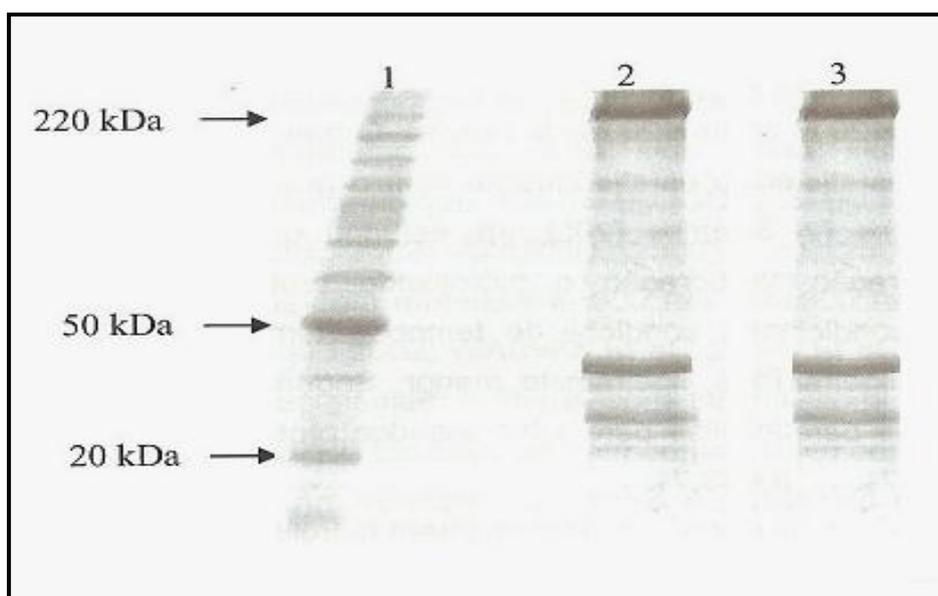
FREITAS et al. (2011), encontraram valores superiores a este estudo ao avaliarem a CRO em isolado proteico obtido de resíduos de anchoita (*Engraulis anchoita*) pelo processo de solubilização alcalina, obtendo um valor de 7,27 mL de óleo / g de proteína.

Em proteínas isoladas de subprodutos do Badejo do Alaska (*Theragra chalcogramma*), SATHIVEL; BECHTEL (2006) obtiveram 3,5 mL de óleo / g de proteína, resultado semelhante a este trabalho.

5.1.3. Eletroforese

O perfil eletroforético obtido para PR esta demonstrado na Figura 7.

Figura 7 – Perfil eletroforético



Onde: (1) proteínas presentes no padrão e (2 e 3) proteínas presentes nas amostras da PR.

Podemos verificar que nas amostras (2 e 3) da proteína recuperada o perfil eletroforético foi semelhante.

Na PR foram observados perfis eletroforéticos típicos das proteínas miofibrilares, com o aparecimento de cadeias de maior massa molecular de miosina (220 kDa) e actina (50 kDa). Também foram observadas outras frações com massa molecular entre 20 e 50 kDa, sugerindo ser cadeias de troponina I, C e T; cadeias leves de miosina, bem como α e β tropomiosina.

Em proteínas recuperadas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), MONTERREY-QUINTERO ; SOBRAL (2000) e TONGNUANCHAN et al. (2011), na avaliação do perfil eletroforético também encontraram cadeias pesadas de miosina, actina e troponina como dominantes, resultado semelhante ao obtido neste trabalho.

Em proteínas miofibrilares isoladas do músculo de corvina e de isolados proteicos de subprodutos da corvina também foi observado, no perfil eletroforético, bandas de menor massa molecular entre 20 e 50 kDa e bandas próximas a 220 kDa. Estes valores indicam segundo Zavareze (2012), a presença de proteínas miofibrilares e comprovam a remoção das proteínas sarcoplasmáticas durante o método de isolamento das proteínas, pois estas proteínas apresentam bandas abaixo de 20 kDa.

5.2. Obtenção e Caracterização do filme

5.2.1. Planejamento experimental

Os resultados referentes ao planejamento experimental no qual se avaliou como respostas: opacidade, solubilidade, resistência à tração, alongação e permeabilidade ao vapor de água dos filmes estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores obtidos pelos filmes de proteína de corvina, correspondente a cada experimento, em relação às variáveis dependentes analisadas.

Experimentos	O* (%)	S* (%)	PVA* (g.mm/(kPa.	RT* (MPa)	E* (%)
1	18,81±0,16 ^{ef}	28,89±0,56 ^{bcd}	9,73±0,06 ^b	3,90±0,05 ^l	18,98±0,12 ⁱ
2	17,03±0,40 ^h	29,35±0,86 ^{bcd}	8,57±0,03 ^e	14,61±0,10 ^a	4,19±0,05 ^q
3	18,40±0,18 ^{efg}	27,57±0,83 ^{fg}	10,53±0,06 ^a	3,31±0,10 ^m	12,98±0,10 ^j
4	20,48±0,16 ^d	26,63±0,92 ^{fgh}	6,29±0,04 ⁱ	5,96±0,20 ⁱ	54,80±0,04 ^e
5	18,86±0,32 ^{ef}	28,06±0,50 ^{cdef}	8,98±0,10 ^d	4,51±0,08 ^k	5,77±0,02 ^p
6	23,33±0,70 ^a	28,92±0,81 ^{bcd}	8,63±0,06 ^e	12,31±0,12 ^d	9,88±0,03 ^m
7	18,76±0,18 ^{efg}	32,05±0,70 ^a	9,23±0,07 ^c	5,35±0,07 ^j	34,82±0,03 ^g
8	20,99±0,16 ^{cd}	33,54±0,31 ^a	8,31±0,03 ^f	14,63±0,07 ^a	12,09±0,13 ^k
9	18,74±0,16 ^{efg}	25,57±0,30 ^h	5,87 ±0,03 ^k	6,81±0,28 ^g	54,08±0,10 ^f
10	17,88±0,30 ^{efgh}	27,36±0,83 ^{efg}	6,10±0,14 ^{ij}	10,44±0,05 ^e	8,61±0,07 ^o
11	17,81±0,42 ^{efgh}	27,58±0,25 ^{efg}	6,91±0,03 ^g	2,08±0,12 ⁿ	22,00±0,08 ^h
12	17,73±0,33 ^{gh}	26,46±0,10 ^{gh}	6,52±0,07 ^h	13,95±0,12 ^b	11,01±0,16 ^l
13	22,47±0,15 ^{ab}	28,12±0,15 ^{cdef}	5,80±0,05 ^k	6,48±0,03 ^h	56,30±0,05 ^d
14	21,82±0,15 ^{bc}	27,86±0,32 ^{defg}	8,45±0,03 ^{ef}	12,96±0,07 ^c	9,14±0,08 ⁿ
15	18,90±0,27 ^e	32,55±0,21 ^a	8,98±0,11 ^d	2,33±0,07 ⁿ	8,64±0,08 ^o
16	22,44±0,08 ^{ab}	28,93±0,25 ^{bcd}	5,35±0,07 ^l	7,54±0,06 ^f	62,39±0,05 ^c
17	20,98±0,89 ^{cd}	29,74±0,12 ^b	5,92±0,05 ^{jk}	3,72±0,07 ^l	70,74±0,21 ^b
18	20,46±0,17 ^d	29,61±0,25 ^{bc}	5,88±0,08 ^k	3,66±0,08 ^l	70,71±0,06 ^b
19	20,91±0,07 ^{cd}	29,63±0,12 ^{bc}	5,93±0,04 ^{jk}	3,70±0,02 ^l	70,69±0,04 ^b
20	20,67±0,13 ^d	29,82±0,23 ^b	5,90±0,04 ^{jk}	3,81±0,04 ^l	70,64±0,14 ^b
Branco	14,99±0,18 ⁱ	22,32±0,77 ⁱ	3,51±0,03 ^m	5,04±0,08 ^j	85,80±0,22 ^a

*Média de 3 repetições ± desvio padrão. Onde: O= Opacidade; S= solubilidade; PVA= Permeabilidade ao Vapor de Água; RT= Resistência à Tração e E= Elongação. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si, pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

Neste estudo a opacidade dos filmes proteicos variou de 14,99% a 23,33% conforme demonstrado na Tabela 4.

Os filmes opacos dificultam a transmissão de luz, o que pode ser uma característica desejada, quando a luz é um fator de deterioração do produto embalado. No entanto, a transparência é uma característica importante em algumas aplicações, como em embalagens de alimentos (FURTADO, 2013). Neste estudo observou-se uma maior opacidade nos filmes proteicos incorporados com óleos essenciais em relação aos filmes sem óleos essenciais, provavelmente pela coloração característica dos óleos.

Rocha (2012), ao avaliar a opacidade em filmes proteicos de anchoita obteve valores entre 13 e 18,1% enquanto ZAVAREZE et al. (2012), em filmes a base de proteínas miofibrilares de pescado obtiveram valores de opacidade que variaram de 12 a 13,5%, valores inferiores ao encontrado neste estudo.

A solubilidade obtida variou de 22,32% a 33,54%, de acordo com a Tabela 4, ocorrendo diferença significativa entre os valores dos experimentos.

A solubilidade dos filmes à base de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo foi verificada por MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL (2000), obtendo valores inferiores a este trabalho, que variaram de 12,3 a 19,5%, sendo este menor valor atribuído a utilização de frações proteicas de alto peso molecular.

A solubilidade em filmes proteicos de anchoita adicionados de diferentes agentes antimicrobianos variou de 27,7 a 65,3% conforme Rocha (2012), sendo estes valores superiores ao encontrado neste trabalho.

GÓMEZ-ESTACA et al. (2010), ao avaliarem filmes de gelatina adicionados de óleo essencial de cravo, observaram um aumento na solubilidade e atribuíram este aumento as interações entre a proteína e polifenóis que enfraquecem a estabilidade da rede proteica, o que também pode ter ocorrido neste trabalho quando incorporado os óleos essenciais ao filme.

Os valores encontrados para a permeabilidade ao vapor de água dos filmes proteicos variaram de 3,51 a 10,53 g.mm /kPa.dia.m², ocorrendo diferença significativa entre os valores dos experimentos.

Conforme Di PIERRO et al. (2006), a permeabilidade ao vapor de água dos filmes aumenta com o incremento da quantidade de proteína, estando diretamente relacionada com o número de grupos polares (grupos laterais dos aminoácidos polares) disponíveis nas cadeias proteicas ($-OH$, $-COOH$ e $-NH_2$), o que foi verificado neste trabalho ao aumentar a quantidade de proteína de 3,0 para 4,0 g na formulação dos filmes proteicos.

Em filmes de proteínas solúveis de surimi de pescado BOURTOOM et al. (2006), obtiveram para permeabilidade ao vapor de água, valores superiores ao deste trabalho, que variaram de 30,41 para 79,96 g.mm / kPa.dia.m² e consideraram este valor elevado a mudanças na estrutura da rede proteica.

Resultados diferentes a este estudo foi verificado em filmes de quitosana incorporados com óleo essencial de *Melaleuca artemifolia* (árvore do chá) e incorporados com óleo de orégano, onde ocorreu uma redução da permeabilidade do vapor de água, atribuindo este fato ao aumento da fração hidrofóbica na formação do filme (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2010; ZIVANOVIC et al., 2005).

Para que sejam utilizados em embalagens os filmes devem possuir propriedades mecânicas de resistência que garantam sua integridade. A resistência à tração é a tensão máxima que o filme pode ser submetido e a alongação é a capacidade do filme em esticar (KHALIL et al., 2013). Os valores de resistência a tração na Tabela 4, variaram entre 2,08 MPa e 14,63 MPa, ocorrendo diferença significativa entre os valores dos experimentos. Com relação à alongação os valores da Tabela 4 variaram de 4,19 % a 85,8%, ocorrendo diferença significativa entre os valores dos experimentos.

Em filmes incorporados com gelatina da pele de lula gigante (*Sepia pharaonis*) HOQUE et al. (2010), encontraram valores variando de 4,99 a 9,66 MPa para resistência a tração e de 15,56 a 51,89% para alongação, sendo estas faixas de valores inferiores as encontradas neste trabalho.

Halal (2012), em filmes de isolado proteico de corvina e óleo de palma, encontrou valores inferiores para resistência à tração e superiores para alongação em relação aos obtidos neste estudo, sendo que este mesmo autor cita que a homogeneização da solução filmogênica é importante, pois a distribuição homogênea na

matriz polimérica esta diretamente ligada à resistência a tração e ao percentual de alongação, formando filmes mais estáveis.

Segundo DEBEAUFORT; VOILLEY (1997), um filme com estrutura heterogênea apresenta descontinuidades na rede o que aumenta a fragilidade do filme, devido a pontos preferenciais de quebra, diminuindo a resistência à tração, fato que pode ter ocorrido neste trabalho devido aos baixos valores de resistência à tração encontrados.

De acordo com GALIETTA et al. (1998), as mudanças na propriedade de alongação caracterizam modificações na organização tridimensional, decrescendo a densidade e reversibilidade das interações intermoleculares ocorridas na rede proteica formadora do filme, com o aumento do volume vazio e da mobilidade da cadeia. Tal fato pode ter ocorrido neste estudo, onde ocorreu uma diminuição da alongação nos filmes nanocompósitos de proteínas incorporados com óleos essenciais em relação ao filme proteico controle sem óleos essenciais.

Após analisados os resultados da Tabela 4, foram selecionados os filmes proteicos levando-se em consideração os que continham óleos essenciais na sua composição e, devido a grande variação ocorrida entre as características analisadas, selecionaram-se os que apresentaram os melhores valores em relação à alongação. Foram selecionados os filmes correspondentes aos experimentos: 4, 9, 13, 16, 18 e branco conforme demonstrado na Tabela 5 e Figura 8.

Tabela 5 – Experimentos selecionados correspondentes aos filmes de proteína de corvina com melhores características.

Experimentos	PR (g)	G (g)	MMT (g)	OEO (mL)	OEC (mL)
4	4,0	1,35	0,4	0	1,0
9	3,0	0,75	0,4	1,0	0
13	3,0	0,75	0,6	1,0	1,0
16	4,0	1,35	0,6	1,0	1,0
18	3,5	1,05	0,5	0,5	0,5
Branco	3,5	1,05	0	0	0

Onde: PR= proteína recuperada; G= glicerol; MMT= montmorilonita; OEO= óleo essencial de orégano e OEC= óleo essencial de cravo

Figura 8 - Filmes nanocompósitos de proteínas de corvina selecionados

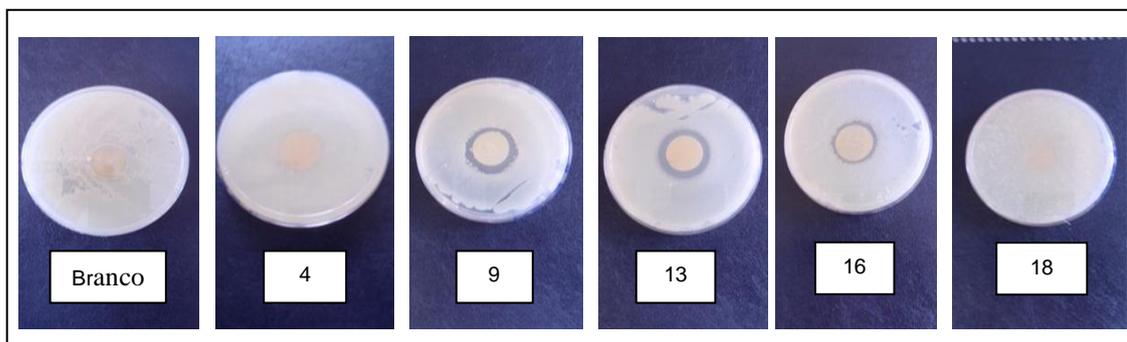


Onde: 4 (4,0 g de PR, 1,35 g de G, 0,4 g de MMT e 1,0 mL de OEC); 9 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,4 g de MMT e 1,0 mL de OEO); 13 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC); 16 (4,0 g de PR, 1,35 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC); 18 (3,5 g de PR, 1,05 g de G, 0,5 g de MMT, 0,5 mL de OEO e 0,5 mL de OEC); Branco (3,5 g de PR e 1,05 g de G).

5.3. Verificação da atividade antimicrobiana dos filmes incorporados com óleos essenciais

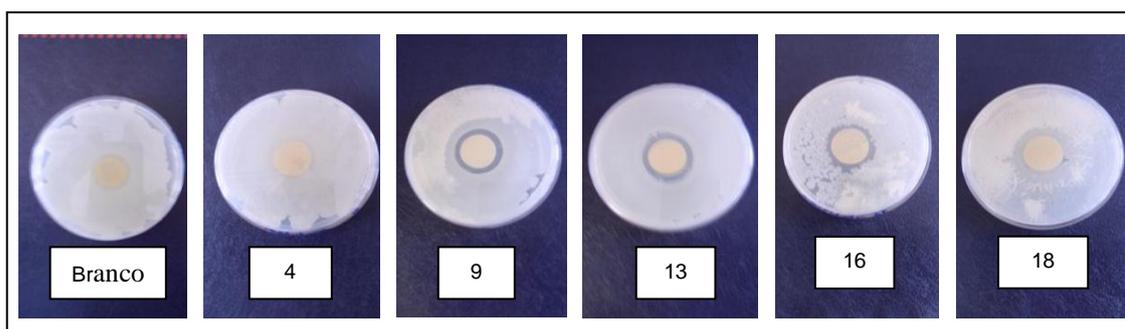
As Figuras 9, 10 e 11 demonstram as placas, inoculadas com os microrganismos utilizados para verificação da atividade antimicrobiana que foram: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Enteritidis*. Nestas placas foram adicionados os discos dos filmes selecionados.

Figura 9 - Placas inoculadas com *Escherichia coli*, contendo discos dos filmes



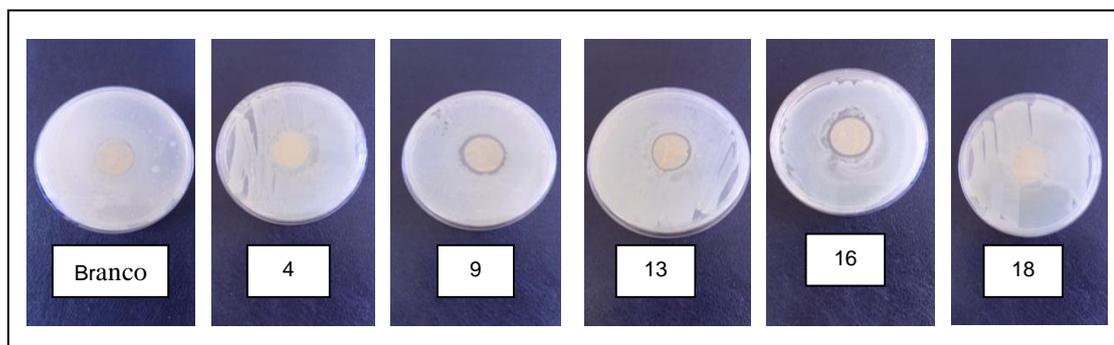
Onde: Branco (3,5 g de PR e 1,05 g de G); 4 (4,0 g de PR, 1,35 g de G, 0,4 g de MMT e 1,0 mL de OEC); 9 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,4 g de MMT e 1,0 mL de OEO); 13 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC); 16 (4,0 g de PR, 1,35 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC); 18 (3,5 g de PR, 1,05 g de G, 0,5 g de MMT, 0,5 mL de OEO e 0,5 mL de OEC).

Figura 10 - Placas inoculadas com *Staphylococcus aureus*, contendo discos dos filmes



Onde: Branco (3,5 g de PR e 1,05 g de G); 4 (4,0 g de PR, 1,35 g de G, 0,4 g de MMT e 1,0 mL de OEC); 9 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,4 g de MMT e 1,0 mL de OEO); 13 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC); 16 (4,0 g de PR, 1,35 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC); 18 (3,5 g de PR, 1,05 g de G, 0,5 g de MMT, 0,5 mL de OEO e 0,5 mL de OEC).

Figura 11 - Placas inoculadas com *Salmonella Enteritidis*, contendo discos dos filmes



Onde: Branco (3,5 g de PR e 1,05 g de G); 4 (4,0 g de PR, 1,35 g de G, 0,4 g de MMT e 1,0 mL de OEC); 9 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,4 g de MMT e 1,0 mL de OEO); 13 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC); 16 (4,0 g de PR, 1,35 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC); 18 (3,5 g de PR, 1,05 g de G, 0,5 g de MMT, 0,5 mL de OEO e 0,5 mL de OEC).

Na Tabela 6, estão demonstrados os valores do diâmetro total do halo de inibição formado pelos filmes proteicos verificados a partir das placas representadas pelas Figuras 9, 10 e 11, para cada microrganismo avaliado.

Tabela 6 - Valores obtidos pelos filmes proteicos em relação à verificação da atividade antimicrobiana através da formação de halo de inibição

Experimento	Diâmetro total do halo de inibição (mm)*		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella Enteritidis</i>
Branco	0 ^c	0 ^c	0 ^b
4	0 ^c	0 ^c	0 ^b
9	28,85 ± 0,04 ^b	29,48 ± 0,09 ^{ab}	24,00 ± 0,40 ^a
13	29,67 ± 0,58 ^a	28,87 ± 0,60 ^b	23,58 ± 0,65 ^a
16	29,20 ± 0,42 ^{ab}	29,76 ± 0,38 ^a	23,00 ± 0,82 ^a
18	0 ^c	0 ^c	0 ^b

*Média de 3 repetições ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Sendo: Branco (3,5 g de PR e 1,05 g de G); 4 (4,0 g de PR, 1,35 g de G, 0,04 g de MMT); 9 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,4 g de MMT e 1,0 mL de OEO); 13 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC); 16 (4,0 g de PR, 1,35 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC); 18 (3,5 g de PR, 1,05 g de G, 0,5 g de MMT, 0,5 mL de OEO e 0,5 mL de OEC).

Conforme demonstrado através das Figuras 9, 10 e 11 e pelos valores da Tabela 6, os experimentos: Branco, 4 e 18 , não formaram halo de inibição em relação aos microrganismos avaliados. Por outro lado, os experimentos 9, 13 e 16 formaram halo de inibição, indicando atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos.

Dos experimentos que apresentaram atividade antimicrobiana, o diâmetro do halo de inibição formado em relação à *Escherichia coli* foi maior nos experimentos 13 e 16, porém não houve diferença significativa entre estes experimentos.

Para o *Staphylococcus aureus* o diâmetro do halo de inibição foi maior nos experimentos 9 e 16, sendo que não houve diferença significativa entre estes experimentos.

O diâmetro do halo de inibição para *Salmonella* Enteritidis não apresentou diferença significativa entre os experimentos 9, 13 e 16.

O experimento branco não continha óleo essencial na sua formulação, enquanto no experimento 4 continha 1 mL de óleo essencial de cravo e o experimento 18 continha 0,5 mL de óleo essencial de cravo e 0,5 mL de óleo essencial de orégano. Neste caso podemos dizer que os filmes proteicos nanocompósitos com óleos essenciais de cravo e orégano nestas concentrações não apresentaram atividade antimicrobiana em relação aos microrganismos avaliados.

No presente trabalho todos os filmes com atividade antimicrobiana, continham 1 mL de óleo essencial de orégano em sua composição. Podemos dizer que o filme que continha apenas 1 mL de óleo de orégano apresentou resultados semelhantes aos que continham 1 mL de óleo essencial de orégano mais 1 mL de óleo essencial de cravo, o que indica que o óleo essencial de cravo nas concentrações testadas não interferiu nos resultados.

Segundo Burt (2004), os óleos essenciais mais eficazes em ordem de sequência para diminuição das atividades antimicrobianas são: orégano > cravo > coentro > tomilho > hortelã > alecrim > mostarda > coentro.

SANTOS et al. (2011), obtiveram resultados semelhantes a este trabalho onde as concentrações inibitórias mínimas variaram entre 0,25% a 1% para os óleos de cravo e orégano em estudo realizado para verificar a atividade antimicrobiana de vários óleos essenciais. Sendo que os diâmetros de inibição foram menores para o óleo de cravo quando comparado com o de orégano para cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella spp.*

Ao utilizarem óleos essenciais de orégano, gerânio, cravo e pimenta, frente a 25 espécies de microrganismos, DORMANS; DEANS (2000) verificaram que o óleo de orégano apresentou uma zona de inibição de 18,9 mm e 29,5 mm sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e sobre as cepas de *Escherichia coli*, respectivamente, inibição esta que também ocorreu neste estudo, enquanto que o óleo de cravo apresentou 14,5 e 11,7mm de inibição para as mesmas cepas, o que não ocorreu no nosso trabalho.

DOBRE et al. (2011), ao estudarem vários óleos essenciais obtiveram para óleo de orégano e cravo resultados semelhantes ao deste trabalho, onde observaram que não ocorreu inibição pelo óleo de cravo e o óleo de orégano apresentou formação de halos de inibição para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis com diâmetros de 26,3, 27 e 43 mm respectivamente.

PELLISSARI et al. (2009), investigaram a atividade antimicrobiana de filmes a base de amido incorporados com óleo essencial de orégano e verificaram uma efetiva inibição no crescimento de *Escherichia coli* O157: H7, *Bacillus cereus*, e *Salmonella* Enteritidis no ensaio de difusão em disco.

Conforme citado por DU et al. (2011), estudos recentes têm mostrado que os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*), canela (*Cinnamom Casia*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*) estão entre os mais ativos contra as cepas de *Escherichia coli*, o que foi confirmado neste estudo em relação a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano.

Em outro estudo, FRIEDMAN et al. (2004a, 2004b), verificaram que o óleo essencial de orégano foi eficaz contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis, e *Staphylococcus aureus*, semelhante ao encontrado neste trabalho.

Hoffmann (1999), após testar óleo de cravo concluiu que este óleo, na concentração de 10,0%, inibiu completamente o crescimento de vinte e um microorganismos testados, dentre eles *Staphylococcus aureus*, *B. cereus* e *Salmonella* Enteritidis. Isto reforça o que ocorreu neste estudo onde não ocorreu a inibição microbiana, provavelmente pela concentração de óleo essencial de cravo utilizada ser de apenas 1,0%.

5.4. Aplicação da solução filmogênica como revestimento em camarões

Utilizou-se nesta etapa as soluções filmogênicas referentes aos filmes nanocompósitos de proteína de corvina obtidos pelos experimentos 9 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,4 g de MMT e 1,0 mL de OEO); 13 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC) e 16 (4,0 g de PR, 1,35 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC) que apresentaram a melhor avaliação em relação à

atividade antimicrobiana. Também foi realizado em paralelo, um tratamento controle sem solução filmogênica.

5.4.1. Análises físico-químicas

5.4.1.1. Perda de massa

Os resultados referentes às análises de perda de massa dos camarões com e sem revestimento no decorrer do tempo analisado estão demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores de perda de massa das amostras de camarões armazenadas a 4 ± 1 °C por 10 dias, utilizando tratamentos sem e com diferentes revestimentos.

Tempo (dias)	Perda de Massa (%)*			
	TC	T9	T13	T16
0	0 ^{aF}	0 ^{aF}	0 ^{aF}	0 ^{aF}
2	5,41 ± 0,22 ^{aE}	4,50 ± 0,30 ^{bE}	4,16 ± 0,12 ^{bE}	4,40 ± 0,35 ^{bE}
4	7,78 ± 0,22 ^{aD}	7,35 ± 0,36 ^{aD}	7,49 ± 0,28 ^{aD}	6,38 ± 0,24 ^{bD}
6	11,27 ± 0,29 ^{aC}	10,85 ± 0,52 ^{aC}	11,56 ± 0,60 ^{aC}	8,44 ± 0,61 ^{bC}
8	14,87 ± 0,86 ^{aB}	13,77 ± 0,95 ^{aB}	13,87 ± 0,15 ^{aB}	11,40 ± 0,95 ^{bB}
10	18,94 ± 0,92 ^{aA}	16,65 ± 0,60 ^{bA}	16,73 ± 0,70 ^{bA}	14,92 ± 0,61 ^{bA}

*Média de 3 repetições ± desvio padrão . Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p\leq 0,05$). Sendo TC= tratamento controle (camarões sem cobertura), T9= tratamento 9 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,4 g de MMT e 1,0 mL de OEO), T13= tratamento 13 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC) e T16= tratamento 16 (4,0 g de PR, 1,35 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC).

De acordo com os valores expressos na Tabela 7, verificamos um aumento na perda de massa dos camarões durante o período de armazenamento em todos os tratamentos, sendo esta perda significativa no decorrer dos 10 dias para todos os tratamentos com e sem revestimento. No décimo dia de armazenamento não houve

diferença significativa entre a perda de massa dos tratamentos com revestimentos T9, T13 e T16, sendo que o T16 apresentou a menor perda de massa 14,92%. Por outro lado o TC sem revestimento diferiu significativamente dos demais tratamentos, apresentando a maior perda de massa (18,94%).

Conforme citado por Cortez-Vega (2011), a redução da perda de massa é devida à presença do revestimento, que atua como agente sacrificante, ou seja, a desidratação do revestimento ocorre antes que a do produto revestido, o que pode ter corrido neste trabalho. Além disso, a menor perda de massa verificada pode ser conferida a menor permeabilidade ao vapor de água com a adição dos óleos essenciais que agiram como barreira.

PIZATO et al. (2013), ao estudarem o efeito de revestimentos com diferentes polissacarídeos em pêssegos minimamente processados e armazenados refrigerados por 12 dias, verificaram um aumento da perda de massa no decorrer dos dias, obtendo no final 7,6% para a menor perda de massa nos pêssegos revestidos contra 34,1% para os sem revestimento, sendo que adição do revestimento provocou o mesmo efeito na perda de massa encontrado neste trabalho.

Em outro estudo que utilizou revestimentos com 1% de quitosana na sua formulação, em maçãs minimamente processadas e armazenadas por 8 dias sob refrigeração, também os resultados foram semelhantes a este estudo, ocorrendo uma diminuição da perda de massa das maçãs revestidas (15%) durante o período de armazenamento em relação as maçãs que não foram revestidas (19%) (QI et al., 2011).

HERNÁNDEZ-MUÑOZ et al. (2008), observaram entre 14,2 e 19,6% de perda de massa de morangos revestidos com quitosana, armazenados a 10°C por 7 dias. Por outro lado, BORGES et al. (2013) utilizando coberturas com óleo essencial de sálvia no revestimento de morangos obtiveram uma redução na perda de massa no tempo final com valores de 10,61 e 4,98% para morangos sem revestimento e revestidos respectivamente, o que concorda com o que foi verificado neste trabalho em relação a diminuição da perda de massa dos camarões ao incorporar óleos essenciais no revestimento.

5.4.1.2. Cor

Os resultados referentes às análises de cor nos camarões com e sem revestimento no decorrer do tempo analisado podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores dos parâmetros utilizados para análise de cor das amostras de camarões, sem e com diferentes revestimentos, armazenadas a 4 ± 1 °C por 10 dias.

Parâmetros	Tempo (dias)	Tratamentos			
		TC	T9	T13	T16
L*	0	52,96 ± 0,30 ^{aA}	51,48 ± 0,30 ^{bA}	51,22 ± 0,31 ^{bA}	51,00 ± 0,17 ^{bA}
	2	52,74 ± 0,07 ^{aA}	51,25 ± 0,09 ^{bA}	50,90 ± 0,17 ^{cA}	50,81 ± 0,12 ^{cAB}
	4	50,42 ± 0,19 ^{bB}	51,01 ± 0,08 ^{aA}	50,82 ± 0,13 ^{aA}	50,75 ± 0,10 ^{abAB}
	6	49,77 ± 0,10 ^{dC}	50,18 ± 0,03 ^{cB}	50,67 ± 0,07 ^{aA}	50,40 ± 0,08 ^{bBC}
	8	46,62 ± 0,08 ^{cD}	48,47 ± 0,16 ^{bC}	49,91 ± 0,05 ^{aB}	50,01 ± 0,08 ^{aCD}
	10	45,63 ± 0,22 ^{cE}	47,36 ± 0,34 ^{bD}	49,40 ± 0,41 ^{aB}	49,70 ± 0,38 ^{aD}
Chroma a*	0	-1,01 ± 0,08 ^{bA}	1,04 ± 0,07 ^{aA}	1,14 ± 0,06 ^{aA}	1,11 ± 0,12 ^{aA}
	2	-1,31 ± 0,08 ^{bB}	0,99 ± 0,01 ^{aA}	1,04 ± 0,06 ^{aAB}	0,99 ± 0,05 ^{aA}
	4	-1,60 ± 0,07 ^{bC}	0,92 ± 0,04 ^{aA}	1,00 ± 0,03 ^{aB}	0,97 ± 0,01 ^{aA}
	6	-2,85 ± 0,06 ^{bD}	0,40 ± 0,11 ^{aB}	0,54 ± 0,06 ^{aC}	0,56 ± 0,01 ^{aB}
	8	-3,83 ± 0,11 ^{cE}	-0,35 ± 0,12 ^{bC}	-0,14 ± 0,02 ^{abD}	-0,12 ± 0,01 ^{aC}
	10	-4,15 ± 0,15 ^{cF}	-1,23 ± 0,12 ^{bD}	-0,64 ± 0,03 ^{aE}	-0,68 ± 0,01 ^{aD}
Chroma b*	0	14,00 ± 0,17 ^{aA}	13,95 ± 0,16 ^{aA}	14,01 ± 0,36 ^{aA}	13,92 ± 0,23 ^{aA}
	2	13,09 ± 0,11 ^{bB}	13,69 ± 0,13 ^{aA}	13,74 ± 0,33 ^{aA}	13,66 ± 0,25 ^{abA}
	4	11,56 ± 0,07 ^{aC}	11,84 ± 0,07 ^{aB}	11,89 ± 0,32 ^{aB}	11,77 ± 0,08 ^{aB}
	6	9,12 ± 0,16 ^{bD}	11,03 ± 0,15 ^{aC}	11,20 ± 0,20 ^{aB}	10,98 ± 0,03 ^{aC}
	8	6,71 ± 0,17 ^{cE}	9,43 ± 0,10 ^{bD}	9,93 ± 0,11 ^{aC}	9,87 ± 0,06 ^{aD}
	10	4,59 ± 0,22 ^{bF}	8,67 ± 0,02 ^{aE}	8,84 ± 0,10 ^{aD}	8,77 ± 0,13 ^{aE}

*Média de 3 repetições ± desvio padrão . Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Sendo TC= tratamento controle (camarões sem cobertura), T9= tratamento 9 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,4 g de MMT e 1,0 mL de OEO), T13= tratamento 13 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC) e T16= tratamento 16 (4,0 g de PR, 1,35 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC).

A luminosidade avaliada diminuiu durante o período de armazenagem em todos os tratamentos (Tabela 8). O TC foi o que obteve o maior percentual (13,84%) em relação aos tratamentos que receberam a cobertura. O tratamento T16 apresentou o menor percentual no décimo dia de armazenamento (2,54%), demonstrando que a utilização do revestimento diminuiu consideravelmente o escurecimento dos camarões, o que pode ser atribuída a ação antioxidante dos óleos essenciais.

Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre o tratamento T13 e o T16 em quase todo o período de armazenamento, exceto no sexto dia, o que demonstra um comportamento semelhante para a variação da luminosidade entre estes tratamentos.

Segundo Cortez-Vega (2011), a estabilidade da luminosidade é atribuída a não ocorrência de reações bioquímicas consequentes do contato com enzimas ou diferenças atribuídas à temperatura, fato que não foi verificado neste trabalho devido à diminuição dos valores de luminosidade.

Conforme Freitas (2010), o revestimento age como barreira à presença do oxigênio, que é necessário para as reações de escurecimento, fato que pode ser observado neste estudo, pois todos os tratamentos que receberam revestimento apresentaram uma menor redução da luminosidade.

Em files bovinos revestidos com biofilmes compostos por gelatina e refrigerados por 4 dias, avaliados por CARDOSO et al. (2011), o valor de L^* permaneceu praticamente constante no decorrer do período analisado, o que não aconteceu neste trabalho.

Em estudo realizado por COSTA et al. (2012), os valores de luminosidade também diminuíram em tomates refrigerados revestidos com coberturas compostas por quitosana e argila, significando que ocorreu escurecimento dos frutos.

A utilização de biofilme de gelatina e cloreto de cálcio na coloração de quiabo armazenado refrigerado, foi avaliada por OLIVEIRA et al. (2012), que observaram um decréscimo no valor da luminosidade no decorrer do tempo, ocorrendo o mesmo com os resultados obtidos neste estudo.

OLIVEIRA et al. (2013), utilizaram óleos essenciais de cravo (*Syzygium aromaticum*) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) em carne bovina moída refrigerada onde verificaram que nas amostras contendo os óleos essenciais a luminosidade diminuiu menos do que na amostra controle, sem óleos, concordando com os valores obtidos no presente trabalho.

Através da Tabela 8, podemos observar que os resultados referentes ao Chroma a^* diminuíram durante o período de armazenagem em todos os tratamentos, com ou sem cobertura. Neste contexto, o TC foi o que obteve a maior queda de Chroma a^* entre todos os tratamentos e o T16 apresentou a menor diminuição de Chroma a^* no decorrer do tempo. Não houve diferença significativa entre o T13 e o T16 em todo o período de armazenamento. Todos os tratamentos ficaram na faixa da neutralidade, já que os valores ficaram no entorno de zero.

Souza (2012), também obteve resultados semelhantes ao avaliar massas alimentícias intercaladas com filmes biodegradáveis de 0% e 1% de sorbato de potássio, os quais apresentaram aumento significativo do parâmetro a^* , onde todos os tratamentos apresentaram valores de a^* negativos, próximos de zero, ou seja, da neutralidade.

CARDOSO et al. (2011), obtiveram em files bovinos revestidos com biofilmes compostos por gelatina e refrigerados por 4 dias, uma diminuição do valor de Chroma a^* no decorrer do período analisado, concordando com o que foi verificado neste trabalho quando utilizado revestimento.

GEORGANTELIS et al. (2007), avaliaram a estabilidade da cor durante o armazenamento de hambúrgueres de carne bovina congelados em relação ao efeito da adição diferentes soluções contendo extrato de alecrim, quitosana e tocoferol, sendo que os valores do Chroma a^* diminuíram no decorrer do tempo, sendo que os hambúrgueres que continham o extrato de alecrim e quitosana foram os que obtiveram a menor diminuição, o que ocorreu neste estudo com adição de óleos essenciais.

Óleos essenciais de cravo (*Syzygium aromaticum*) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) foram utilizados em carne bovina moída refrigerada ocorrendo também uma menor diminuição no valor do Chroma a^* nas amostras que continham óleos essenciais em relação a amostra controle, sem óleos (OLIVEIRA et al., 2013).

Em relação ao Chroma b* os resultados da Tabela 8 indicam uma diminuição durante o período de armazenagem em todos os tratamentos, com ou sem cobertura. No TC foi onde ocorreu a maior queda do Chroma b* (67%) entre todos os tratamentos e os T9, T13 e T16 apresentaram praticamente a mesma diminuição de Chroma b* (37,00%) no decorrer do tempo. Não houve diferença significativa entre os tratamentos T9, T13 e T16 em todo o período de armazenamento, o que demonstra o comportamento semelhante entre os tratamentos. Os resultados indicam que houve um aumento na intensidade da coloração em direção à cor azul.

CARDOSO et al. (2011), verificaram que o valor de b* diminuiu após o decorrer do período analisado em files bovinos revestidos com biofilmes compostos por gelatina e refrigerados por 4 dias, o que também ocorreu neste trabalho quando os camarões foram revestidos.

Os resultados do Chroma b* também diminuíram durante o armazenamento de hambúrgueres de carne bovina congelados, adicionados de diferentes soluções contendo extrato de alecrim, quitosana e tocoferol, sendo que os hambúrgueres que continham o extrato de alecrim e a quitosana foram os que obtiveram a menor diminuição (GEORGANTELIS et al., 2007).

OLIVEIRA et al. (2013), utilizaram óleos essenciais de cravo (*Syzygium aromaticum*) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) em carne bovina moída refrigerada e verificaram que nas amostras contendo os óleos essenciais o Chroma b* diminuiu menos do que na amostra controle durante o período analisado, concordando com os resultados deste trabalho.

Conforme citado por Cortez-Vega (2011), uma diminuição dos valores de Chroma a* e Chroma b* podem indicar um escurecimento oxidativo, fato este que pode ter ocorrido neste estudo.

5.4.1.3. Firmeza

A variação da firmeza dos camarões, sem e com revestimentos, em função dos dias de armazenamento pode ser observada na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores de firmeza das amostras de camarões sem e com diferentes revestimentos, armazenadas a 4 ± 1 °C por 10 dias.

Tempo (dias)	Firmeza (N) *			
	TC	T9	T13	T16
0	$57,13 \pm 0,36^{bA}$	$58,93 \pm 0,33^{aA}$	$58,15 \pm 0,32^{abA}$	$57,93 \pm 0,65^{abA}$
2	$49,27 \pm 0,47^{bB}$	$52,46 \pm 0,26^{aB}$	$53,00 \pm 0,21^{aB}$	$52,81 \pm 0,45^{aB}$
4	$42,74 \pm 0,19^{bC}$	$48,57 \pm 0,26^{aC}$	$48,27 \pm 0,39^{aC}$	$48,18 \pm 0,20^{aC}$
6	$38,34 \pm 0,35^{cD}$	$45,21 \pm 0,37^{bD}$	$46,39 \pm 0,15^{aD}$	$47,15 \pm 0,26^{aC}$
8	$36,58 \pm 0,06^{cE}$	$41,06 \pm 0,30^{bE}$	$43,11 \pm 0,64^{aE}$	$42,93 \pm 0,37^{aD}$
10	$34,61 \pm 0,27^{cF}$	$38,66 \pm 0,24^{bF}$	$40,81 \pm 0,12^{aF}$	$40,49 \pm 0,56^{aE}$

*Média de 3 repetições \pm desvio padrão . Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Sendo TC= tratamento controle (camarões sem cobertura), T9= tratamento 9 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,4 g de MMT e 1,0 mL de OEO), T13= tratamento 13 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC) e T16= tratamento 16 (4,0 g de PR, 1,35 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC).

Pela Tabela 9 verificamos que com o decorrer do tempo de armazenamento a firmeza das amostras de camarões refrigerados diminuiu e apresentou diferença significativa para todos os tratamentos. O TC apresentou a maior perda de firmeza ao final de 10 dias com 39,41%, enquanto a menor perda de firmeza foi observada para os tratamentos T13 e T16, entorno de 30,00%. Não houve diferença significativa entre os valores de firmeza do T13 e T16 com a variação do tempo, indicando um comportamento semelhante destes tratamentos.

MEDEIROS et al. (2011), estudaram a firmeza da polpa de manga armazenada com sachês contendo óleo essencial de orégano e verificaram que a polpa sem os sachês teve uma maior perda de firmeza em relação a polpa armazenada com sachês contendo óleo essencial de orégano, concordando com os resultados deste trabalho ao utilizar revestimentos incorporados com óleos essenciais.

Revestimentos compostos por quitosana e argila foram aplicados em tomates refrigerados pelo método *dipping* por COSTA et al. (2012), sendo que os valores de firmeza também diminuiram durante o período de armazenamento.

PIZATO et al. (2013), observaram um pequeno aumento na firmeza durante o período de 12 dias em pêssegos minimamente processados com diferentes revestimentos de polissacarídeos e citaram que este aumento pode estar diretamente relacionado à perda de massa dos pêssegos por evaporação ou exsudação que promove a secagem dos tecidos superficiais, discordando com o que foi observado neste trabalho onde ocorreu uma diminuição da firmeza.

5.4.1.4. pH

Os valores de pH dos camarões, sem e com revestimentos, no decorrer do tempo estão demonstrados na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores de pH das amostras de camarões, sem e com diferentes revestimentos, armazenadas a 4 ± 1 °C por 10 dias

Tempo (dias)	pH*			
	TC	T9	T13	T16
0	6,41 ± 0,10 ^{aF}	6,41 ± 0,10 ^{aE}	6,41 ± 0,10 ^{aF}	6,41 ± 0,10 ^{aE}
2	6,60 ± 0,02 ^{aE}	6,55 ± 0,03 ^{abD}	6,51 ± 0,03 ^{bE}	6,48 ± 0,03 ^{bD}
4	6,87 ± 0,03 ^{aD}	6,64 ± 0,01 ^{bD}	6,58 ± 0,02 ^{cD}	6,52 ± 0,01 ^{dCD}
6	7,33 ± 0,01 ^{aC}	6,87 ± 0,01 ^{bC}	6,64 ± 0,01 ^{cC}	6,57 ± 0,01 ^{dC}
8	7,89 ± 0,01 ^{aB}	7,10 ± 0,01 ^{bB}	6,96 ± 0,02 ^{cB}	6,75 ± 0,02 ^{dAB}
10	10,44 ± 0,01 ^{aA}	8,87 ± 0,04 ^{bA}	7,45 ± 0,02 ^{cA}	6,81 ± 0,02 ^{dA}

*Média de 3 repetições ± desvio padrão . Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Sendo TC= tratamento controle (camarões sem cobertura), T9= tratamento 9 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,4 g de MMT e 1,0 mL de OEO), T13= tratamento 13 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC) e T16= tratamento 16 (4,0 g de PR, 1,35 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC).

Podemos observar pela Tabela 10, um aumento nos valores de pH dos camarões com o decorrer do período de armazenamento, apresentando diferença significativa entre os tratamentos a partir do segundo dia. Foi verificada uma menor variação do pH nos camarões que receberam revestimento do que no controle (TC) o qual apresentou o maior valor de pH (10,44) ao final dos 10 dias de armazenamento. O T16 apresentou o menor resultado de todos os tratamentos, 6,81, ao final do período de análise, diferenciando-se significativamente dos demais tratamentos.

O pescado é considerado adequado para o consumo de acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), quando o pH da carne é inferior a 6,8 (BRASIL, 1952). Neste contexto, o TC no quarto dia de tratamento ultrapassou o limite do valor de pH considerado aceitável para o consumo humano, enquanto no T9 o limite foi atingido no sexto dia, no T13 no oitavo dia e, o T16 apresentou o melhor resultado pois o limite foi atingido apenas no décimo dia.

Segundo SEABRA et al. (2011), a elevação no valor do pH pode ser atribuída a elevação de compostos alcalinos como amônia, a partir de bactéria ou ainda, pelo aumento das N-BVT resultante da decomposição de compostos nitrogenados por enzimáticas endógenas e/ou microrganismos, o que foi verificado neste trabalho com o aumento da N-BVT.

De acordo com Vieira (2004), a medida do pH não deve ser utilizada individualmente como índice de frescor, pois pode induzir a falsa avaliação. No entanto, seus valores geralmente acompanham, paralelamente, análises químicas, microbiológicas e sensoriais, concordando com o que foi realizado neste estudo através de análises químicas e microbiológicas nos camarões.

A avaliação do pH foi realizada por IMRAN et al. (2013), ao caracterizar a degradação da qualidade de camarão refrigerado (*Litopenaeus vannamei*), sendo que o pH inicial das amostras foi de 6,62 e aumentou para 7,6 após 4 dias de estocagem, resultados estes superiores ao encontrado neste estudo para este mesmo período de estocagem.

PUGA-LÓPEZ et al. (2013), encontraram valores iniciais de pH superiores a este trabalho, ao avaliarem a qualidade em músculo de camarões branco (*Litopenaeus*

vannamei), marinhos e de cativeiro, encontrando valores médios de pH de 7,38 nas análises iniciais.

Os valores de pH obtidos apresentaram uma média de 7,61 no estudo realizado por Furlan (2013), para verificar a qualidade e valorização de camarões sete-barbas armazenados em gelo, valor este superior ao encontrado neste estudo.

Ao verificarem a influência das condições de comercialização do camarão cru descascado resfriado SANTOS et al. (2013), encontraram um valor médio de pH de 7,13, citando que a medida que o pH chega a neutralidade e avança para a alcalinidade demonstra que o músculo está entrando em estado de decomposição, aumento este que foi verificado pelos resultados de pH obtidos nos camarões avaliados neste trabalho.

5.4.1.5. N-BVT (Bases Voláteis Totais)

Os valores de N-BVT dos camarões, sem e com revestimentos, durante o período de armazenagem podem ser verificados através da Tabela 11.

Tabela 11 - Valores de N-BVT das amostras de camarões, sem e com diferentes revestimentos, armazenadas a 4±1 °C por 10 dias.

Tempo (dias)	N-BVT (mgN/100g) *			
	TC	T9	T13	T16
0	12,51 ± 0,65 ^{aE}	12,51 ± 0,65 ^{aE}	12,51 ± 0,65 ^{aD}	12,51 ± 0,65 ^{aE}
2	14,05 ± 0,40 ^{abE}	12,73 ± 0,40 ^{bE}	13,39 ± 0,76 ^{abD}	14,27 ± 0,40 ^{aD}
4	18,43 ± 0,65 ^{aD}	15,36 ± 0,09 ^{bD}	15,58 ± 0,76 ^{bC}	17,77 ± 0,66 ^{aC}
6	75,50 ± 0,97 ^{aC}	24,14 ± 0,86 ^{bC}	21,51 ± 0,40 ^{cB}	21,94 ± 0,40 ^{cB}
8	87,92 ± 0,52 ^{aB}	25,90 ± 0,76 ^{bB}	22,82 ± 0,40 ^{cB}	23,05 ± 0,66 ^{cB}
10	129,44 ± 0,50 ^{aA}	80,14 ± 0,62 ^{bA}	56,85 ± 0,32 ^{cA}	24,80 ± 0,40 ^{dA}

*Média de 3 repetições ± desvio padrão . Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Sendo TC= tratamento controle (camarões sem cobertura), T9= tratamento 9 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,4 g de MMT e 1,0 mL de OEO), T13= tratamento 13 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC) e T16= tratamento 16 (4,0 g de PR, 1,35 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC).

Os valores de N-BVT aumentaram nos camarões armazenados refrigerados durante o período analisado, apresentando diferença significativa a partir do segundo dia em todos os tratamentos (Tabela 11). O TC que não recebeu revestimento foi o que apresentou o maior valor no final do período ($129,44 \pm 0,50$ mgN/100g). Entre os tratamentos que receberam revestimento o T13 e T16 foram os que apresentaram os menores aumentos nos valores de N-BVT, não apresentando diferença significativa entre os valores encontrados para estes tratamentos até o oitavo dia. O T16 foi o que obteve o menor valor entre todos os tratamentos no final de 10 dias ($24,80 \pm 0,40$ mgN/100g). As diferenças entre as amostras do TC sem revestimento e das amostras dos tratamentos com revestimento pode ser associada à ação antimicrobiana dos óleos essenciais.

De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), o máximo aceitável de Bases Voláteis Totais (BVT) para o pescado ser considerado fresco é de 30mg de nitrogênio por 100g de carne (BRASIL, 1952). Neste sentido, o TC no sexto dia de tratamento ultrapassou o limite do valor de N-BVT considerado aceitável para o consumo humano, nos T9 e T13 o limite foi ultrapassado apenas no décimo dia armazenamento enquanto que o T16 foi o melhor tratamento, pois o limite não foi atingido após 10 dias de armazenamento.

Segundo FAN et al. (2009), o N-BVT é um parâmetro que quantifica os compostos constituídos por amônia e aminas primárias, secundárias e terciárias, sendo amplamente utilizado como um indicador de deterioração dos tecidos muscular, sendo que a qualidade e tempo de armazenamento de pescados podem diminuir devido à ação de enzimas durante a fase posterior de armazenagem, originando um odor forte, que muitas vezes está relacionada à quebra de proteínas e a produção de materiais voláteis nitrogenadas, concordando com o que foi verificado neste estudo em relação a diminuição do tempo de armazenagem nos camarões sem revestimento.

Efeito de revestimentos à base de quitosana sobre a vida de prateleira de salmão (*Salmo solar*) armazenado a 0°C por 18 dias foi estudado por Souza (2010), onde o mesmo também verificou um aumento no valor de N-BVT no decorrer dos dias, sendo superior nos filmes que não foram revestidos com quitosana.

5.4.1.6. TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)

Os valores de TBARS dos camarões, sem e com revestimentos, durante os dias de tratamento estão demonstrados na Tabela 12.

Tabela 12 - Valores de TBARS das amostras de camarões, sem e com diferentes revestimentos, armazenadas a 4 ± 1 °C por 10 dias.

Tempo (dias)	TBARS (mgMA/kg)*			
	TC	T9	T13	T16
0	$0,62 \pm 0,01^{aC}$	$0,62 \pm 0,01^{aC}$	$0,62 \pm 0,01^{aCD}$	$0,62 \pm 0,01^{aC}$
2	$0,45 \pm 0,02^{abD}$	$0,48 \pm 0,02^{aD}$	$0,46 \pm 0,01^{aE}$	$0,41 \pm 0,01^{bE}$
4	$0,50 \pm 0,01^{aCD}$	$0,55 \pm 0,06^{aCD}$	$0,58 \pm 0,01^{aD}$	$0,58 \pm 0,01^{aD}$
6	$0,62 \pm 0,01^{aC}$	$0,62 \pm 0,05^{aC}$	$0,65 \pm 0,01^{aC}$	$0,65 \pm 0,01^{aC}$
8	$1,20 \pm 0,10^{aB}$	$0,84 \pm 0,01^{bB}$	$0,72 \pm 0,05^{bB}$	$0,70 \pm 0,01^{bB}$
10	$1,42 \pm 0,04^{aA}$	$1,37 \pm 0,03^{aA}$	$1,15 \pm 0,01^{bA}$	$0,95 \pm 0,01^{cA}$

*Média de 3 repetições \pm desvio padrão . Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Sendo TC= tratamento controle (camarões sem cobertura), T9= tratamento 9 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,4 g de MMT e 1,0 mL de OEO), T13= tratamento 13 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC) e T16= tratamento 16 (4,0 g de PR, 1,35 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC).

Conforme os valores de TBARS observados na Tabela 12, ocorreu uma diminuição dos valores em todos os tratamentos do tempo zero ao tempo 2, provavelmente devido ao efeito da diminuição da temperatura da amostra. Por outro lado, do segundo dia até o final do período de armazenamento, todos os tratamentos apresentaram um aumento nos valores de TBARS. O TC que não recebeu revestimento foi o que apresentou o maior valor no final do período ($1,42 \pm 0,04$ mgMA/kg). Até o sexto dia não houve diferença significativa entre os valores de todos os tratamentos, no oitavo dia apenas os tratamentos que receberam revestimento T9, T13 e T16 não apresentaram diferença significativa entre os valores. No final dos 10 dias de armazenamento o T16 foi o melhor tratamento, apresentando o menor valor entre todos os tratamentos ($0,95 \pm 0,01$ mgMA/kg).

Na legislação brasileira não existe limite estabelecido para TBARS e conforme citado por SANTOS et al. (2013), o produto pode ser considerado em bom estado, apresentando valores abaixo de 3,0 mgMA/kg de amostra, sendo os limites de oxidação lipídica para o consumo é de 7 a 8 mgMA/kg no alimento. Neste contexto os resultados encontrados de TBARS (Tabela 12), para todos os tratamentos, ficaram dentro dos valores considerados aceitáveis dentro do período avaliado, mantendo o frescor dos camarões.

Segundo CARDOSO et al. (2010) , o TBARS é amplamente utilizado e mede o nível de compostos que são responsáveis pelos sabores e odores indesejáveis, causados por reações sofridas pelos ácidos graxos insaturados que provocam a deterioração dos alimentos tornando-os impróprios para o consumo, sendo importante durante os últimos estágios da oxidação lipídica, sendo que neste estudo ocorreu um aumento nos valores de TBARS porém não chegando a deteriorar os camarões.

A estabilidade oxidativa da carne bovina *in natura* refrigerada por 8 dias e revestida com filme de gelatina contendo extratos de alecrim e orégano foi verificada por CARDOSO et al. (2010), os quais obtiveram um aumento nos valores de TBARS no decorrer dos dias até o final do período, sendo que as amostras com revestimentos contendo os extratos de alecrim e orégano obtiveram um valor de TBARS muito inferior (0,5 mgMA/kg) ao controle que não possuía revestimento (1,6 mgMA/kg), resultados que seguem a mesma tendência encontrada neste trabalho quando utilizado os revestimentos contendo óleos essenciais, os quais possuem propriedades antioxidantes.

O efeito da adição de soluções contendo extrato de alecrim, quitosana e tocoferol na oxidação de lipídios durante o armazenamento de hambúrgueres de carne bovina congelados foi verificado por GEORGANTELIS et al. (2007), sendo que os hambúrgueres que continham o extrato de alecrim e quitosana foram os que tiveram o menor valor no final do período analisado, demonstrando que adição destes componentes diminui as reações de oxidação lipídica, o que também foi observado neste estudo com a incorporação de óleos essenciais nos revestimentos.

5.4.2. Análises microbiológicas

Na avaliação das amostras de camarões (*Litopenaeus vannamei*) sem e com revestimento, utilizadas neste estudo, não foi detectada a presença de *Salmonella* spp., indicando que os resultados estão dentro do padrão exigido pela legislação brasileira (BRASIL, 2001) que é a ausência em 25g para crustáceos *in natura* resfriados.

De acordo com SHABARINATH et al. (2007), as bactérias do gênero *Salmonella* são classificadas como patógenos entéricos responsáveis por surtos associados ao consumo de organismos aquáticos, que podem provocar febre, vômito e diarreia e, seu habitat é o intestino de animais homeotermos, sendo que a sua presença em camarão tem relação estreita com contaminação de origem fecal, fato que não foi observado neste trabalho.

COSTA et al. (2011), ao estudarem a presença de microrganismos patógenos em camarão (*Litopenaeus vannamei*) comercializado *in natura* também obtiveram ausência de *Salmonella* spp. nas amostras analisadas e classificaram as unidades amostrais como próprias para o consumo.

Resultado diferente do obtido neste estudo, ocorreu na avaliação realizada por SANTOS et al. (2013) em relação a *Salmonella* spp. no comércio de camarão cru descascado resfriado, onde ocorreu a presença desta bactéria na maioria das amostras analisadas, sendo atribuído este fato a etapa de descasque que pode ocasionar rompimento do intestino, *habitat* primário da *Salmonella* spp. e promover extravasamento do conteúdo intestinal com conseqüente contaminação fecal.

Além dos microrganismos citados pela legislação brasileira como padrões indicativos de qualidade, o grupo coliforme também se destaca como indicador de contaminação fecal em pescados e, conforme COSTA et al. (2011), pertencente a esse grupo está o gênero *Escherichia coli* que possui como habitat primário o trato intestinal de animais endotérmicos, mas pode ocorrer no solo e em vegetais, sendo que neste estudo não foi verificada a contaminação por este microrganismo.

De acordo com PARENTE et al. (2011), a legislação vigente no Brasil não estipula limites para *Escherichia coli* em camarões *in natura*. No entanto, a Comunidade Européia que é um dos principais importadores de camarão cultivado no

Brasil, através da “Comission Decision” de 15 de dezembro de 1992 limita o número mais provável (NMP) de *Escherichia coli* por grama em camarão em 100 NMP/g. Neste contexto, os valores de NMP/g encontrados para *Escherichia coli* nos camarões avaliados neste trabalho foram inferiores a 10^2 NMP/g, indicando que os valores ficaram dentro dos limites aceitáveis citados por PARENTE et al. (2011).

O padrão exigido pela legislação brasileira para *Staphylococcus coagulase positiva* em relação número de unidade formadora de colônia/grama (UFC/g) é de no máximo, 10^3 UFC/g para crustáceos *in natura* resfriados (BRASIL, 2001). Neste trabalho, não foram detectadas a presença de colônias típicas de *Staphylococcus coagulase positiva* nas amostras de camarões, não havendo a necessidade do teste de confirmação, o que sugere ausência de tal microrganismo na matéria-prima e indica que o processamento foi conduzido em condições higiênico-sanitárias adequadas.

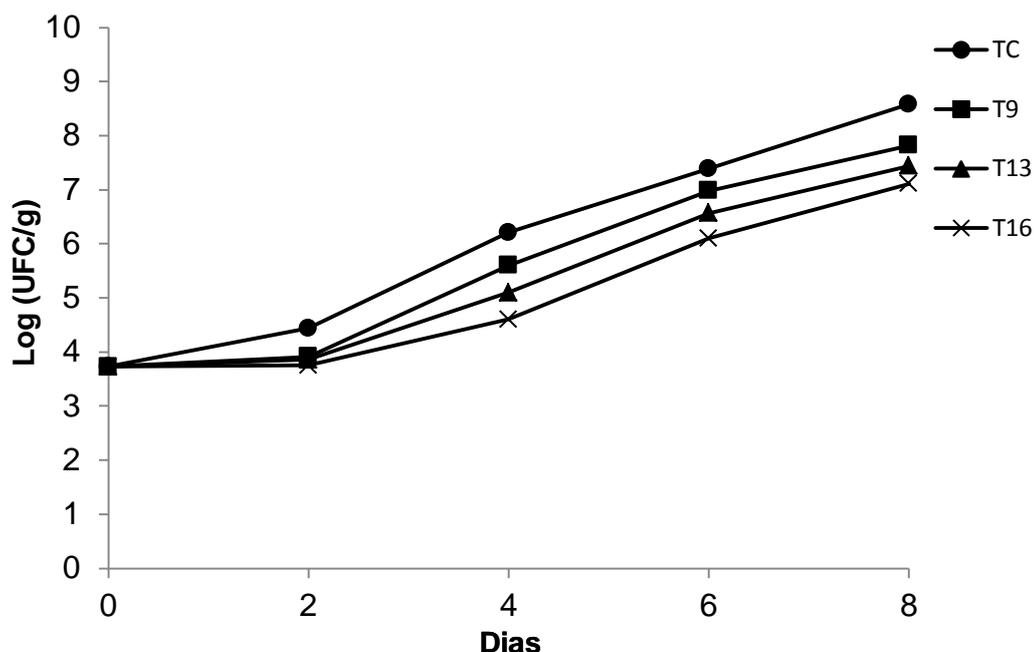
SANTOS et al. (2013), ao avaliarem a influência das condições de comercialização de camarão cru descascado resfriado obtiveram, em todas amostras analisadas, resultados superiores ao exigido pela legislação para *Staphylococcus coagulase positiva* e citaram que estes resultados podem estar relacionados à presença de irregularidades na fase de estocagem, como ausência e/ou quantidade insuficiente de gelo em contato com o camarão, gelo apenas na porção inferior da pilha de camarões, camarões previamente pesados e embalados na ausência de refrigeração e flutuações na temperatura de estocagem, o que não ocorreu neste estudo.

Na avaliação de camarões comercializados em diferentes apresentações Born (2012), também encontrou valores para *Staphylococcus coagulase positiva* dentro do estabelecido pela legislação.

Foram verificados resultados diferentes aos deste trabalho em parte das amostras avaliadas por COSTA et al. (2011), ao estudarem a presença de microrganismos patógenos em camarão (*Litopenaeus vannamei*) comercializado *in natura*, onde obtiveram em 16,7% das amostras analisadas limites superiores ao exigido pela legislação para *Staphylococcus coagulase positiva*, relatando o despreparo dos manipuladores como sendo uma das causas prováveis pela ocorrência desse grupo bacteriano no crustáceo avaliado.

O crescimento dos microrganismos psicrófilos foi avaliado durante o período de armazenagem dos camarões, sem e com revestimentos, conforme demonstrado na Figura 12.

Figura 12 - Crescimento de microrganismos psicrófilos em amostras de camarões, sem e com revestimentos, armazenadas a 4 ± 1 °C por 8 dias.



Onde: TC = tratamento controle (camarões sem revestimento), T9 = tratamento 9 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,4 g de MMT e 1,0 mL de OEO), T13 = tratamento 13 (3,0 g de PR, 0,75 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC) e T16 = tratamento 16 (4,0 g de PR, 1,35 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC).

Conforme Fernandes (2006), os microrganismos psicrófilos são aqueles que crescem em temperaturas baixas e são encontrados em águas frias, oceanos e regiões polares, sendo os que mais influenciam na qualidade dos produtos armazenados refrigerados e um dos maiores responsáveis pela deterioração de pescados. De acordo com a Figura 12, podemos observar um aumento da carga microbiana dos microrganismos psicrófilos com o decorrer do tempo em todos os tratamentos. Os camarões do TC (sem revestimento) apresentaram maior crescimento de microrganismos no final de 8 dias de armazenamento, alcançando um valor de 8,58 Log UFC.g⁻¹ enquanto que o tratamento T16 (com revestimento contendo óleo de orégano e

cravo) foi o que apresentou o melhor resultado, com menor crescimento microbiano ($7,1 \text{ Log UFC.g}^{-1}$) em 8 dias de armazenamento.

O limite estabelecido para microrganismos psicrófilos em crustáceos crus é de 10^7 UFC/g segundo a ICMSF (1986). Neste sentido, somente o T16 chegou até o oitavo dia dentro do limite. Com isso podemos dizer que ocorreu um aumento na vida útil dos camarões de 5 para 8 dias quando aplicado o revestimento.

A contagem de microrganismos psicrófilos aumentou durante o período de 12 dias em maçãs minimamente processados sem e com diferentes revestimentos, sendo que o menor aumento ocorreu nas maçãs que continham revestimento (PIZATO et al., 2013).

Na avaliação de filme antimicrobiano aromatizado aplicado em massa de pastel ocorreu um menor crescimento dos microrganismos psicrófilos em relação à massa controle no decorrer do período de armazenamento em refrigeração (MORAES et al., 2011).

Outros microrganismos, não avaliados neste estudo, como a *Salmonella* Enteritidis e a *Listeria monocytogenes* foram inibidos com a aplicação de óleos essenciais na superfície de pescado inteiro ou como revestimento para camarões (BURT, 2004; HAYOUNI et al., 2008).

OLIVEIRA et al. (2013), verificaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais em relação a outro microrganismo não avaliado neste estudo, ao testarem óleos essenciais de cravo (*Syzygium aromaticum*) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) em carne bovina moída refrigerada e inoculada com *Listeria monocytogenes*, onde foi verificado que nas amostras contendo os óleos essenciais a população de *Listeria monocytogenes* diminuiu e até mesmo não foi detectada no final do período analisado.

CORTEZ-VEGA et al. (2014), observaram ao avaliarem amostras de mamão Formosa minimamente processados, com revestimentos a base de proteína isolada de corvina e montmorilonita, uma diminuição no crescimento de microrganismos psicrófilos em relação ao as amostras de mamão sem revestimento, o que também foi

verificado neste trabalho com a utilização de revestimentos proteicos com montmorilonita e óleos essenciais.

Com base nos resultados verificados na avaliação microbiológica, a solução filmogênica contendo 4,0 g de PR, 1,35 g de G, 0,6 g de MMT, 1,0 mL de OEO e 1,0 mL de OEC, referente ao tratamento 16 (T16), foi a que apresentou os melhores resultados, quando aplicada como revestimento, em camarões in natura armazenados refrigerados.

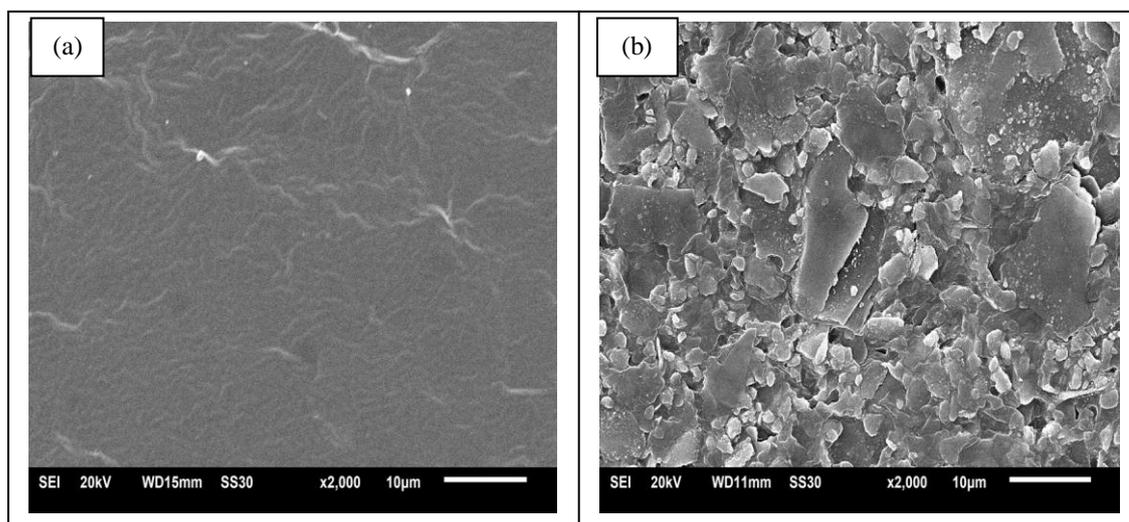
5.4.3. Avaliação da microestrutura e das propriedades térmicas do filme

Nesta etapa foi avaliado o filme proteico referente ao tratamento 16 que apresentou o melhor resultado na aplicação. Também foi realizada em paralelo uma avaliação do filme contendo 3,5 g de PR e 1,05 g de G, correspondente ao tratamento branco, sem os óleos essenciais.

5.4.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na Figura 13 podemos observar as características da superfície dos filmes obtidos através do tratamento 16 (T16) e do tratamento branco.

Figura 13 - Micrografias das superfícies dos filmes proteicos de corvina



Onde: (a) filme referente ao tratamento branco (3,5 g de proteína recuperada e 1,05 g de glicerol) e (b) filme referente ao tratamento 16 (4,0 g de proteína recuperada, 1,35 g de glicerol, 0,6 g de montmorilonita, 1,0 mL de óleo essencial de orégano e 1,0 mL de óleo essencial de cravo).

É importante destacar que a morfologia das partículas foi afetada pela incorporação de óleos essenciais aos filmes, conforme pode ser observado na Figura 13, sendo que o tratamento 16 apresentou uma superfície mais heterogênea, quando comparado com o filme padrão (branco). Além disso, o filme referente ao T16 apresenta uma maior porosidade em relação ao filme branco, o que justifica a maior permeabilidade ao vapor de água obtida pelo mesmo.

CHANA-THAWORN et al. (2011), ao avaliarem a morfologia dos filmes incorporados com extrato de madeira (*Cotyleobium lanceotatum*), verificaram que a adição do extrato modificou a estrutura da rede polimérica, aumentando a mesma em seu volume livre, deixando-a menos densa e conseqüentemente aumentando a porosidade do filme em relação ao filme controle sem extrato, o que também ocorreu neste estudo.

De acordo com PASTOR et al. (2010), a estrutura final do filme depende das interações entre os componentes da formulação e a sua disposição durante a formação na etapa de secagem, o que pode ter influenciado nas superfícies observadas neste trabalho entre o filme proteico sem óleos essenciais e o filme incorporado com óleos essenciais.

SOUZA et al. (2011), ao estudarem filmes biopoliméricos de quitosana incorporados com diferentes óleos, verificaram que os filmes incorporados com óleo de arroz ou ácido esteárico obtiveram superfícies irregulares, atribuindo este fato à separação de fases ou maior tensão de superfície que resultou em maiores discontinuidades na estrutura dos filmes e possivelmente proporcionou a formação de caminhos preferencias para a difusão de vapor de água, o que também ocorreu neste trabalho com o aumento da permeabilidade ao vapor de água nos filmes incorporados com óleos essenciais.

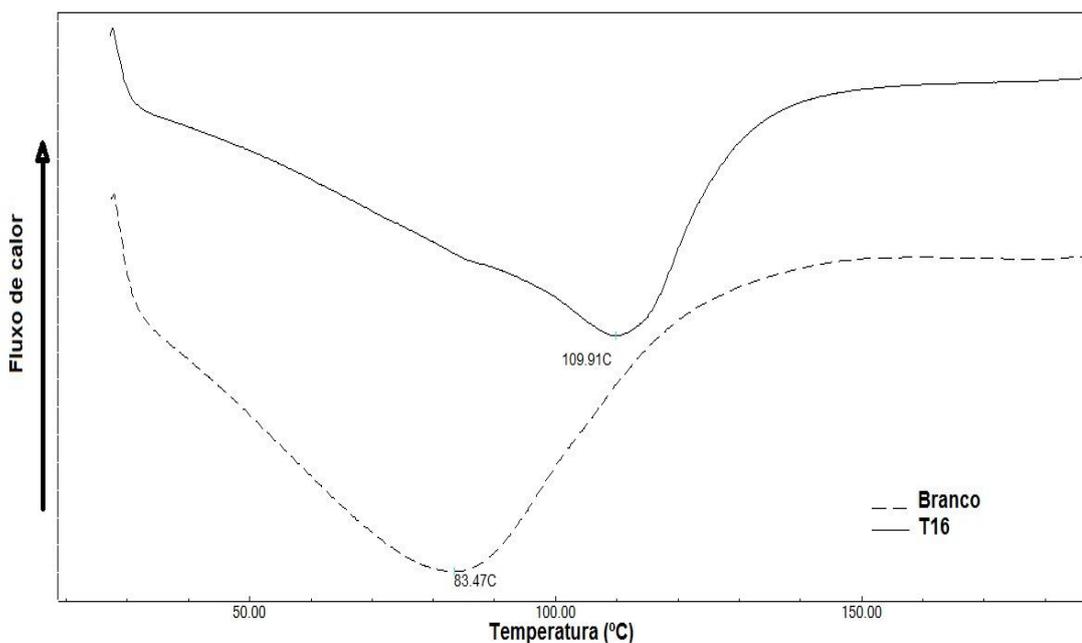
5.4.3.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Conforme Bandeira (2013), esta análise mede as temperaturas e o fluxo de calor associados com as transições dos materiais em função da temperatura e do tempo, e fornecem informações sobre mudanças físicas e químicas que envolvem processos

endotérmicos, como transições de fase, desidratações, reduções e algumas reações de decomposição, e exotérmicos, como cristalização, oxidação, reações de decomposição, ou mudanças na capacidade calorífica.

Através da Figura 14 podemos verificar o termograma de DSC obtido para os filmes proteicos correspondentes ao Tratamento 16 (T16) e o branco.

Figura 14 - Termogramas de DSC dos filmes proteicos de corvina



Onde: Branco (3,5 g de proteína recuperada e 1,05 g de glicerol) e T16 (4,0 g de proteína recuperada, 1,35 g de glicerol, 0,6 g de montmorilonita, 1,0 mL de óleo essencial de cravo e 1,0 mL de óleo essencial de cravo).

De acordo com a Figura 14, para o T16 observa-se um pico endotérmico com as seguintes características: temperatura inicial da reação próxima a 32°C, temperatura do pico de 109,91°C e ΔH de 421,01 J/g. A temperatura do pico observada corresponde à temperatura de fusão do T16 e o ΔH medido pela integração da área do pico endotérmico se refere ao calor latente de fusão do filme T16 ($\Delta H_{\text{fusão}}$) e representa a energia necessária para elevar o estado de agitação molecular que leva o composto do estado sólido para o estado líquido. Para o branco, temos um pico endotérmico com as seguintes características: temperatura inicial da reação de entorno de 32°C, temperatura de fusão de 83,47°C e $\Delta H_{\text{fusão}}$ de 320,0 J/g. Neste sentido, podemos observar através dos

valores obtidos, que o T16 contendo óleos essenciais aumentou a temperatura e o calor latente de fusão do filme, quando comparado com o filme sem óleos essenciais, indicando um aumento na estabilidade da rede polimérica, gerando uma maior estabilidade térmica do filme quando incorporado com óleos essenciais.

Filmes a base de quitosana submetidos a diferentes tratamentos com campo elétrico apresentaram, de acordo com Souza (2010), maiores valores para temperatura de fusão e da entalpia de fusão maiores do que no filme controle sem aplicação de campo elétrico, atribuindo este aumento à cristalização dos filmes de quitosana, indicando que as formas cristalinas, e a estrutura da quitosana foram alteradas o que também ocorreu neste trabalho com a adição de óleos essenciais no filme proteico.

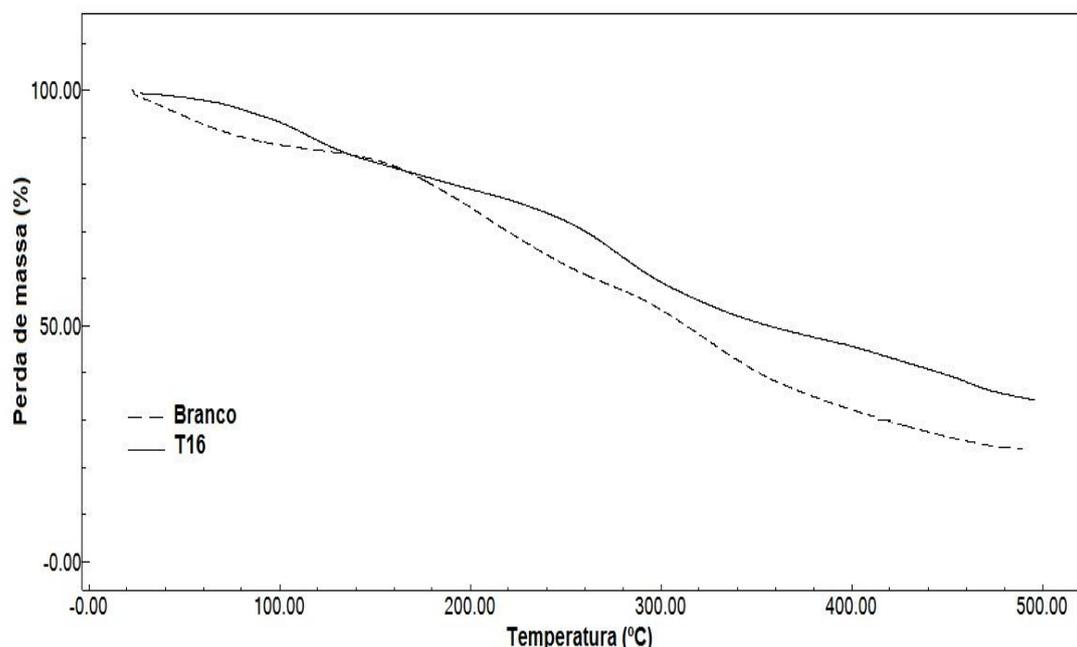
Um aumento na temperatura e na entalpia de fusão de filmes de gelatina submetidos a diferentes temperaturas de secagem foi verificada por HOQUE et al. (2010), que atribuíram este aumento a uma maior interação na rede polimérica afetando a estabilidade térmica do filme pela presença de interações intermoleculares na proteína, tais como ligações de hidrogênio, interações iônicas e interações hidrofóbica, as quais estabilizam a rede polimérica do filme, o que também pode ter ocorrido nos filmes avaliados neste trabalho.

Halal (2012), ao avaliar filmes a base de isolado proteico de corvina e óleo de palma verificou através de DSC um aumento na temperatura de fusão do filme quando utilizado 2% de isolado proteico e 10% de óleo de palma em relação ao filme sem adição de óleo de palma, sendo que os picos apresentaram apenas um pico de fusão, característico de atrizes poliméricas que não apresentam separação de fases, semelhante ao ocorrido neste estudo.

5.4.3.3. Termogravimetria (TGA)

As mudanças estruturais do polímero quando submetido ao tratamento térmico, podem ser verificadas através da perda de massa nos filmes correspondentes ao tratamento 16 (T16) e ao tratamento branco, através da Figura 15.

Figura 15 - Termogramas de TGA dos filmes proteicos de corvina



Onde: Branco (3,5 g de proteína recuperada e 1,05 g de glicerol) e T16 (4,0 g de proteína recuperada, 1,35 g de glicerol, 0,6 g de montmorilonita, 1,0 mL de óleo essencial de cravo e 1,0 mL de óleo essencial de cravo).

Através da Figura 15 podemos descrever dois estágios principais. No primeiro estágio de 30 a 110°C o filme correspondente ao tratamento 16 apresentou uma menor perda de massa (7,9%) em relação ao filme correspondente ao tratamento branco que apresentou (10,24%). Neste estágio a menor perda de massa no T16 esta relacionada à presença de óleos essenciais e nanoargila na rede polimérica o que diminuiu a volatilização dos componentes, enquanto a maior perda de massa no branco esta relacionada principalmente a volatilização da água.

No segundo estágio de 110 a 500°C também se verificou que o filme do T16 apresentou a menor perda de massa (56,7%) em relação ao branco que apresentou (64,06%). Neste estágio a menor perda de massa no T16 pode estar relacionada à traços de óleos essenciais na rede do polímero e, a degradação das proteínas, enquanto a maior perda de massa no branco esta relacionada principalmente a degradação da proteína.

A perda de massa residual no final do processo avaliado (500°C) foi maior no filme do tratamento 16 com 35,4% enquanto que no filme correspondente ao tratamento

branco foi de 25,7%. Neste sentido, podemos afirmar que o filme proteico contendo óleos essenciais diminuiu a perda de massa do filme em relação ao filme proteico sem a incorporação de óleos essenciais.

Em filmes de pectina incorporados com extrato de própolis os valores encontrados por Corrêa (2011), também demonstram uma diminuição da perda de massa no filme incorporado com extrato quando comparado ao filme sem extrato, quando avaliados na faixa de 30 a 500°C.

CHANA-THAWORN et al. (2011), comprovaram que nos filmes incorporados com extrato de madeira (*Cotyleobium lanceotatum*), a adição do extrato diminuiu a perda de massa em relação ao filme controle sem extrato quando avaliados por termogravimetria, resultado este que confere com o verificado neste estudo.

Na análise de TGA em filmes a base de gelatina de peixe submetida a diferentes temperaturas de secagem verificou-se um aumento da perda de massa em todos os tratamentos, sendo a perda de massa menor nos filmes secos a 60°C (CHIOU et al, 2009). Neste trabalho o filme proteico incorporado com óleos essenciais apresentou a menor perda de massa, no entanto, foi seco a 40°C.

Filmes biodegradáveis a base de proteína de tilápia, formulados com diferentes concentrações de plastificantes foram avaliados através de TGA por SOBRAL et al. (2005), onde foi observado uma maior perda de massa em função do aumento da concentração do plastificante, o que não foi verificado neste estudo já que a concentração de plastificante era maior no filme proteico correspondente ao tratamento 16 que apresentou a menor perda de massa.

Resultado diferente a este estudo foi obtido por Halal (2012), na qual através do TGA obteve praticamente a mesma perda de massa em filmes a base de isolado proteico de corvina com e sem adição de óleo de palma.

Com base nos resultados obtidos podemos dizer que o filme correspondente ao tratamento 16 (4,0 g de proteína recuperada, 1,35 g de glicerol, 0,6 g de montmorilonita, 1,0 mL de óleo essencial de cravo e 1,0 mL de óleo essencial de cravo), embora tenha apresentado uma maior porosidade, foi o que demonstrou maior estabilidade térmica e menor perda de massa.

6. CONCLUSÕES

- Foi possível recuperar as proteínas miofibrilares da corvina (*Micropogonias furnieri*) através do processo de lavagem (1 CMS : 4 solução), obtendo-se na proteína recuperada um elevado conteúdo proteico de 94,62% em base seca;
- Nos filmes nanocompósitos incorporados com óleos essenciais, obteve-se resultados inferiores em relação ao filme proteico controle (contendo apenas proteína recuperada e glicerol), com diminuição das propriedades mecânicas, aumento na opacidade, na solubilidade e na permeabilidade ao vapor de água;
- Foi possível obter filmes nanocompósitos antimicrobianos com óleos essenciais incorporados à rede proteica, sendo que a utilização de óleos essenciais como agente antimicrobiano foi confirmada e os filmes incorporados com no mínimo 1% (v/v) de óleos essenciais na sua composição apresentaram atividade antimicrobiana em relação à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Enteritidis*, destacando-se os incorporados com óleo essencial de orégano.
- A aplicação de revestimentos incorporados de óleos essenciais em camarões (*Litopenaeus vannamei*) crus descascados e armazenados refrigerados melhorou a conservação, estabilidade e diminuiu a ação microbiana no decorrer do período analisado. Sendo que o revestimento composto por 4,0 g de proteína recuperada, 1,35 g de glicerol, 0,6 g de montmorilonita, 1,0 mL de óleo essencial de orégano e 1,0 mL de óleo essencial de cravo foi o que apresentou os melhores resultados na aplicação, aumentando a vida útil dos camarões de 5 para 8 dias em relação aos camarões sem revestimento.
- O filme nanocompósito que continha em sua composição 4,0 g de proteína recuperada, 1,35 g de glicerol, 0,6 g de montmorilonita, 1,0 mL de óleo essencial de orégano e 1,0 mL de óleo essencial de cravo apresentou uma superfície mais porosa, uma maior estabilidade e uma menor perda massa quando submetido ao aquecimento em relação ao filme controle (3,5 g de proteína recuperada e 1,05 g de glicerol).

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar o processo de obtenção dos filmes para melhorar as características mecânicas e de permeabilidade ao vapor de água;
- Produzir filmes biodegradáveis a partir de proteínas obtidas de outras espécies de pescado com a incorporação de óleos essenciais;
- Testar outros óleos essenciais e comparar a atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados neste trabalho e a outros que sejam de interesse;
- Estudar novas aplicações para os filmes antimicrobianos obtidos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFONSO, R. S.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p. 146 -161, 2012.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4ª ed., Washington, 2001.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. Washington, 2000.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15th ed. Washington, 1990.

ASCENÇÃO, V. L.; FILHO, V. E. M. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia). **Caderno Pesquisa**, São Luís, v. 20, n. especial, 2013.

ASTM. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard methods of water vapor transmission of materials**. Método: E00996-00. In: ASTM annual book of ASTM standards, p. 907-914, 2000b.

ASTM. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard test methods for tensile properties on thin plastic sheeting**. Método: D00882-00. In: ASTM annual book of ASTM standards, p.160-168, 2000a.

ASTM. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard terminology relating to plastics – D 883**, Annual book of ASTM, Philadelphia, PA: 1999.

BANDEIRA, S. F. **Produção de filmes de gelatina obtida a partir de resíduos de corvina, modificados com quitosana**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande – FURG, 120 p., 2013

BARBOSA, L. N. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer**

bovino e testes de aceitação. Dissertação de Mestrado em Biologia Geral e Aplicada. Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, 106 p., 2010.

BATISTA, I.; PIRES, C.; NELHAS, R. Extraction of Sardine Proteins by Acidic and Alkaline Solubilisation. **Food Science and Technology International**, v. 13, n. 3, p. 189-194, 2007.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Fish, whales, crustaceans, mollusks. **Food Chemistry**. Berlin, Heidelberg: Springer, p. 619-642, 2004.

BENAVIDES, S. A.; VILLALOBOS-CARVAJAL, R. B.; Reyes, J. E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 232–239, 2012.

BERY, C. C. S.; NUNES, M. L.; SILVA, G. F.; SANTOS, J. A. B.; BERY, C. S. Estudo da viabilidade do óleo de vísceras de peixes marinhos (*Seriola Dumerlii* (ARABAIANA), *Thunnus ssp* (ATUM), *Scomberomorus cavala* (CAVALA) e *Carcharrhinus spp* (CAÇÃO) comercializados em Aracaju-SE para a produção de biodiesel. **Revista GEINTEC**, São Cristóvão, SE, v.2, n.3, p. 297-306, 2012.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 3ª ed., 238 p., 2003.

BONACINA M.; QUEIROZ M. I. Elaboração de empanado a partir da corvina (*Micropogonias furnieri*). **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v. 27, p. 544-552, 2007.

BORGES, C. D.; MENDONÇA, C. R. B. ; ZAMBIAZI, R. C.; NOGUEIRA, D.; PINTO, E. M.; PAIVA, F. F. Conservação de morangos com revestimentos à base de goma xantana e óleo essencial de sálvia. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 5, p. 1071-1083, 2013.

BORN, L. C. **Pesquisa de *Sthaphylococcus coagulase positiva* em camarões comercializados em diferentes apresentações**. Monografia, Especialização em Produção, Higiene e Tecnologia de alimentos de Origem animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul– UFRGS, 21 p., 2012.

BOURTOOM, T.; CHINNAN, M.S.; JANTAWAT, P.; SANGUANDEKUL, R. Effect of select parameters on the properties of edible film from water-soluble fish proteins in surimi wash water. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 39, p. 406- 419, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC Nº 12, de 12 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**: Decreto Nº 30691 de 29 de março de 1952. Seção 1- Capítulo 7 – Pescados e Derivados. Diário Oficial da União, Brasília, DF, p. 71-73, 1952.

BRAGA, L. R; PERES, L. Novas tendências em embalagens para alimentos: Revisão. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 28, n. 1, p. 69-84, 2010.

BUDKA, D.; KHAN, N.A. The Effect of *Ocimum basilicum*, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* essential oils on *Bacillus cereus* in Rice-Based Foods. **European Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 17-20, 2010.

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

BUSATTA, C. **Caracterização química e atividade antimicrobiana *in vitro* e em alimentos dos extratos de orégano e manjerona**. Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI). Erechim – RS, 94 p., 2006.

CAMILO, A. G.; FONSECA, G. G.; CAVENAGHI, A. D.; AZAMBUJA, P. H. **Obtenção de concentrado proteico a partir de carne mecanicamente separada de pescado pintado**. Anais do 8º Encontro de Iniciação Científica (ENIC). Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul – UEMS, n.2, 2010.

CAMPOS, C. A.; GERSCHENSON, L. N.; FLORES, S. K. Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. **Food Bioprocess Technology**, v.4, p. 849–875, 2011.

CARDOSO, G. P.; RETTORE, D. M.; DUTRA, M. P.; OLIVEIRA, C. A.; RAMOS, E. M.; RAMOS, A. L. S. **Efeito da aplicação de biopolímeros a base de gelatina e do acondicionamento na cor objetiva de carne bovina in natura**. Anais I CONAN-Congresso Nacional de Alimentação e Nutrição, Editora UFOP, Universidade Federal de Ouro Preto – MG, p. 440-446, 2011.

CARDOSO, G. P.; RAMOS, E. M.; FARIA, C. H. M.; RAMOS, A. L. S. **Estabilidade oxidativa de carne bovina in natura refrigerada revestida em biofilme de gelatina contendo extratos de alecrim e orégano**. Resumos do XIX Congresso de Pós-graduação da UFLA – Universidade Federal de Lavras, MG, 2010.

CHALAMAIAH, M.; RAO, G.; RAO, D. G.; JYOTHIRMAYI, T. “Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties”, **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 652-657, 2010.

CHANA-THAWORN, J. N.; CHANTHACHUM, S.; WITTAYA, T. Properties and antimicrobial activity of edible films incorporated with kiam wood (*Cotyleobium lanceotatum*) extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 284-292, 2011.

CHANG, Y. P.; KARIM, A. A.; SEOW, C. C. (2006). Interactive plasticizing-antiplasticizing effects of water and glycerol on the tensile properties on tapioca starch films. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 1-8.

CHIOU, B. S.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; BECHTEL, P. J.; IMAM, S. H.; GLENN, G. M.; ORTS, W. J. Effects of drying temperature on barrier and mechanical properties of cold-water fish gelatin films. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 327–331, 2009.

CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute. Document M2-A8 – **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test**; Approved Standard – Eight Edition, v. 23, 2003.

COMA, V. Bioactive packaging Technologies for extendend shelf life of meat-based products. **Meat Science, Barking**, v.78, n. 1-2, p. 90-103, 2008.

CORRÊA, S. J. P. **Utilização de filmes a base de pectina contendo extrato de própolis vermelha para recobrimento de sementes de girassol**. Dissertação de Mestrado em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes - UNIT, 80 p., 2011.

CORTEZ-VEGA, W. R. **Desenvolvimento de filmes nanocompósitos de isolado protéico de corvina (*Micropogonias furnieri*)**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande-FURG, 139 p., 2011.

CORTEZ-VEGA, W. R.; FONSECA, G. G.; FEISTER, V. A.; SILVA, T. F.; PRENTICE, C. Evaluation of frankfurters obtained from croaker (*Micropogonias furnieri*) surimi and mechanically deboned chicken meat surimi-like material. **CyTA - Journal of Food**, p. 1-10, 2012.

CORTEZ-VEGA, W. R.; BAGATINI, D. C.; SOUZA, J. T. A.; PRENTICE, C. Biofilmes nanocompósitos obtidos de isolado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*) e Montmorilonita: Avaliação das propriedades físicas, mecânicas e de barreira. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 2, p. 90-98, 2013.

CORTEZ-VEGA, W. R.; PIZATO, S.; SOUZA, J. T. A.; PRENTICE, C. Using edible coatings from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) protein isolate and organo-clay nanocomposite for improve the conservation properties of fresh-cut 'Formosa' papaya. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. Article in press, 6 p., 2014.

COSTA, T. L. E.; OLIVEIRA, T. A.; SANTOS, F. K. G.; AROUCHA, E. M. M.; LEITE, R. H. L. Avaliação de coberturas comestíveis compostas por quitosana e argila no revestimento em tomates sob refrigeração pelo método dipping. **Revista Verde**, Edição Especial, v. 7, n. 5, p. 12-19, 2012.

COSTA, R. A.; MOREIRA, B. A. B.; CARVALHO, F. C. T.; MENEZES, F. G. R.; SILVA, C. M.; VIEIRA, R. H. S. F. *Staphylococcus coagulase positiva* e enterobactérias em camarão *Litopenaeus vannamei* comercializado in natura. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 4, p. 566-71, 2011.

COSTA, P. G.; FONTANA, A.; VEIGA, I.; PRENTICE, C. Caracterização Funcional e Nutricional de um Isolado Protéico Obtido a Partir de Resíduos de Camarão Rosa (*Farfantepenaeus paulensis*), **Alimentação e Nutrição**, v. 18, n. 1, p. 7-18, 2007.

CRAKEL, R. L.; GRAY, I. J.; PEARSON, A. M.; BOOREN, A. M.; BUCKLEY, O. J. Some further observations on the TBA. Test as an index of lipid oxidation in meats. **Food Chemistry**, v. 28, p. 187-196, 1988.

CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.; GUILBERT, S. Functional Properties of Myofibrillar Protein-Based Biopackaging as Affected by Film Thickness, **Journal of Food Science**, v. 61, n. 3, p. 580-584, 1996.

DAVIDSON P. M., TAYLOR M. T. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds, in **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, p. 713–734, 2007.

DAVIDSON, P. M.; SOFOS, J. N.; BRANEN, A. L. **Antimicrobials in Food**, Third Edition. Series: Food Science and Technology, Taylor & Francis Group, LLC, New York, 720p., 2005.

DAVIDSON, P. M.; HARRISON, M. A. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. **Food Technology**, v. 56, n. 11, p. 69-78, 2002.

DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Methylcellulose-Based Edible Films and Coatings: Mechanical and Thermal Properties as a Function of Plasticizer Content. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 45, p. 685-689, 1997.

DENAVI, G.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R.; ANON, M. C.; SOBRA, P. J. A.; MAURI, A. N.; MENEGALLI, F. C. Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 341-349, 2009.

DI PIERRO, P.; CHICO, B.; VILLALONGA, R.; MARINIELLO, L.; DAMAIO, A. E.; MASI, P.; PORTA, R. Chitosan-Whey Protein Edible Films Produced in the Absence or Presence of Transglutaminase: Analysis of Their Mechanical and Barrier Properties. **Biomacromolecules**, Washington, v. 7, n. 3, p. 744-749, 2006.

DIAS, G. E. A. **Óleo essencial de Orégano (*Origanum vulgare L.*) como melhorador de desempenho de frangos de corte.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro- UFRRJ, 63 p., 2011.

DOBRE, A. A.; GAGIU, V.; PETRU, N. Antimicrobial activity of essential oils against food-borne bacteria evaluated by two preliminary methods. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 16, n. 6, p. 119-125, 2011.

DORMAN, H.; DEANS, S. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DU, W. X.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; HUA, S. S. T.; T. H. McHUGH. Antimicrobial volatile essential oils in edible films for food safety. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.** A. Méndez-Vilas(Ed) ©FORMATEX, p.1124-1134, 2011.

DURANGO, A. M.; SOARES, N. F.; ARTEAGA, M. R. Filmes y revestimientos comestibles como empaques activos biodegradables em la conservación de alimentos. **Biotecnologia em el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 9, n. 1, p. 112-118, 2011.

EMIROGLU, Z. K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, v. 86, p. 283-288, 2010.

FAN, W. J.; SUN, J. X.; CHEN, Y. C.; QIU, J.; ZHANG, Y.; CHI, Y. L. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. **Food Chemistry**. v. 115, p. 66-70, 2009.

FARRO, P. C.; PODADERA, G.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C. Development of films based on quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willdenow) starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 839–848, 2010.

FELTES, M. M. C.; CORREIA, J. F. G.; BEIRÃO, L. H.; BLOCK, J. M.; NINOW, J. L.; SPILLER, V. R. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.6, p. 669–677, 2010.

FERNANDES, A. M. R. Sistema para avaliação da qualidade de pescados. **Revista Produção Online**, v. 6, n. 3, p. 71, 2006.

FONKWE L. G.; Singh, R. K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis, **Process Biochemistry**, v. 31, p. 605-616, 1996.

FONTANA, A.; CENTENARO, G. S.; PALEZI, S. C.; PRENTICE- HERNÁNDEZ, C. Obtenção e Avaliação de Concentrados Proteicos de Corvina (*Micropogonias furnieri*) Processados por Extração Química, **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2203-2299, 2009.

FORTUNY, R. C. S.; BELLOSO, M.O. New advances in extending the shelf-life of fresh-cut fruits: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, n. 9, p. 5774-5779, 2003.

FREITAS I. R. **Otimização do Processo de Obtenção de Isolados Proteicos Provenientes de Pescado de Baixo Valor Comercial**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, 2011.

FREITAS, I. R.; GAUTÉRIO, G. V.; RIOS, D. G.; PRENTICE, C. Functionality of Protein Isolates from Argentine Anchovy (*Engraulis anchoita*) Residue Obtained Using pH Shift Processing. **Journal of Food Science and Engineering**, v. 1, n. 5, p. 374-378, 2011.

FREITAS, I. R. **Goma xantana como carreadora de solução conservadora e cloreto de cálcio aplicado à maçã minimamente processada**. Monografia (Especialização em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Pelotas - UFPel, Pelotas, 2010.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; LEVIN, C. E.; MANDRELL, R. E. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6042-6048, 2004a.

FRIEDMAN, M.; BUICK, R.; ELLIOTT, C. T. Antibacterial activities of naturally occurring compounds against antibiotic-resistant *Bacillus cereus* vegetative cells and spores, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Protection**, v. 6, p. 1774-1778, 2004b.

FUKAYAMA, E.H.; BERTECHINI, A. G.; GERALDO, A.; KATO, R. K.; MURGAS, L.D.S.. Extrato de orégano como aditivo em rações para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2316-2326, 2005.

FURLAN, E. F. **Qualidade e valorização do camarão sete-barbas (*Xiphopeneus kroyeri*, Heller, 1862): Aspectos sensoriais e vida útil em gelo**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública. Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, 167 p., 2013.

FURTADO, A. S. **Produção, avaliação e aplicação de filmes nanocompósitos obtidos a partir de extrato proteico da microalga *Spirulina platensis***. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, 146 p., 2013.

GALDEANO, M.C.; GROSSMANN, M. V. E; MALI, S.; BELLO-PEREZ, L. A.; GARCIA, M. A.; ZAMUDIO-FLORES, P. B. Effects of production process and plasticizers on stability of films and sheets of oat starch. **Materials Science and Engineering: C**, v.29, n. 2, p. 492-498, 2009.

GALIETTA, G.; Di GIOLA, L.; GUIBERT, S.; CUQ, B. Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 12, p. 3123-3130, 1998.

GALINDO, L. A.; PULTRINI, A. M.; COSTA, M. Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, n. 4, p. 436-41, 2010.

GEORGANTELIS, D.; BLEKAS, G.; KATIKOU, P.; AMBROSIADIS, I.; FLETOURISA, D. J. Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on lipid oxidation and colour stability during frozen storage of beef burgers. **Meat Science**, v. 75, p. 256–264, 2007.

GÓMEZ-ESTACA. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. **Food Microbiology**, v.27, p. 889-896, 2010.

GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do Pescado: Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação**. Editora: Atheneu, São Paulo, 608 p., 2011.

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

GUIMARÃES, S. S.; LUCKMANN, D.; GOUVÊA, A.; CITADIN, I.; MAZARO, S. M. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.38, n.7, p. 1824-1829, 2008.

GUND, J. **Avaliação Sensorial do comportamento da proteína do soro de leite bovino, como emulsificante em embutido de pescado**. In: 3º Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Simpocal. Universidade Federal de Santa Catarina. 2005.

HALAL, S. L. M. **Desenvolvimento e caracterização de filmes a base de isolado proteico de resíduos de corvina (*Micropogonias furnieri*) e óleo de palma**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande-FURG, 126 p., 2012.

HAYOUNI, E. A.; CHRAIEF, I.; ABEDRABBA, M.; BOUIX, M.; LEVEAU, J. Y.; MOHAMMED, H.; HAMDI, M. Tunisian *Salvia officinalis L.* and *Schinus molle L.* essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. **Int. Journal Food Microbiology**, v. 125, p. 242-251, 2008.

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; ALMENAR, E.; DEL VALLE, V.; VELEZ, D.; GAVARA, R. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage. **Food Chemistry**, London, v. 110, n. 2, p. 428–435, 2008.

HOFFMANN, F. L.; SOUZA, S. J. F.; GARCIA-CRUZ, C. H.; VINTURIM, T. M.; DUTRA, A. L. Determinação da atividade antimicrobiana “*in vitro*” de quatro óleos essenciais de condimentos e especiarias. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 11-20, 1999.

HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v.22, n.4, p.273-92, 2005.

HOQUE, S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Effect of heat treatment of film-forming solution on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 66-73, 2010.

HOSSAIN, M. A.; AL-HASHMI, WELI, R. A.; A. M.; AL-RIYAMI, AL-SABAHIB, Q.; J. N. Constituents of the essential oil from different brands of *Syzgium caryophyllatum* L by gas chromatography-mass spectrometry. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 1446-1449, 2012.

IBAMA/CEPERG. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis/Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros Lagunares e Estuarinos. **Desembarque de pescado no Rio Grande do Sul: 2011**. Projeto Estatística Pesqueira. Rio Grande, RS, 40 p., 2012.

ICMSF. International Commission on Microbial Specifications for Foods. **Microorganisms in Foods. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications**. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications. 1986.

IMRAN, A.; CHAWALIT, J.; SOMROTE, K. Characterization of quality degradation during chilled shrimp (*Litopenaeus vannamei*) supply chain. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 4, p. 1833-1842, 2013.

KHALIL, M. S.; AHMED, Z. S.; ELNAWAWY, A. S. Evaluation of the Physicochemical Properties and Antimicrobial Activities of Bioactive Biodegradable Films. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 6, n.1, p. 51-60, 2013.

KARBOWIAK T.; GOUGEON, R. D.; RIGOLET, S.; DELMOTTE, L.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Diffusion of small molecules in edible films: Effect of water and interactions between diffusant and biopolymer. **Food Chemistry**, v.106, n.4, p.1340-1349, 2008.

KELLEHER, S. D.; HULTIN, H. O. Process for Isolating a Protein Composition from a Muscle Source and Protein Composition, **Advanced Protein Technologies Inc.**, Rockport, 1999.

KHALIL, M. S.; AHMED, Z. S.; ELNAWAWY, A. S. Evaluation of the Physicochemical Properties and Antimicrobial Activities of Bioactive Biodegradable Films. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 6, n.1, p. 51-60, 2013.

KUHN, C. R.; SOARES, G. J. D. Proteases e inibidores no processamento de surimi. *Revista Brasileira Agrociência*, v.8 n. 1, p. 5-11, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAGARÓN, J. M.; OCIO, M. J.; LÓPEZ-RUBIO, A. **Antimicrobial polymers**, John Wiley & Sons, Inc., 608 p., 2012.

LIU, Q.; BAO, H.; XI, C.; MIAO, H. Rheological characterization of tuna myofibrillar protein in linear and nonlinear viscoelastic regions. **Journal of Food Engineering**, v.21, p. 58–63, 2014.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J., “Protein measurement with the folin phenol reagent”, **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MARTINS, W. S. **Inquérito exploratório referente à geração, armazenamento, transporte e descarte de resíduos em indústrias de pesca do Brasil**. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, SP, 99 p., 2011.

MEDEIROS, E. A. A.; SOARES, N. F. F.; POLITO, T. O. S.; SOUSA, M. M.; SILVA, D. F. P. Sachês antimicrobianos em pós-colheita de manga. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, Volume Especial, p. 363-370, 2011.

MELLO, S. C. R. P.; FREITAS M. Q.; CLEMENTE, S. C. S.; FRANCO, R. M.; NOGUEIRA, E. B.; PINTO, M. D. S. R. Caracterização química e bacteriológica de polpa e surimi obtidos do espinhaço residual da filetagem de tilápia. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 648-653, 2010.

MONTERREY-QUINTERO, E.S.; SOBRAL, P. J. A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-Nilo para elaboração de biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.1, p.179-189, 2000.

MORAES, A. R. F.; VIDIGAL M. C. T. R.; SOARES, N. F. F.; MORAES, L. P.; MELO, N. R.; GONÇALVES, M. P. J. Desenvolvimento e avaliação de filme antimicrobiano aromatizado para aplicação em massa de pastel. **Ciência Rural**, v. 41, n. 3, 2011.

NAIARETTI, D. G.; TITA, O. Biopolymers used in food packaging: a review. **Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology**, v. 16, n. 2, 2012.

NUR HANANI, Z.A.; McNAMARA, J.; Y.H.; ROOS, KERRY, J.P. Effect of plasticizer content on the functional properties of extruded gelatin-based composite films. **Food Hydrocolloids**. v. 31, p. 264-269, 2013.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri: Manole, 612 p., 2006.

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

OLIVEIRA, T. L. C.; CARDOSO, M. G.; R. A. SOARES; RAMOS, E. M.; R. H. PICCOLI.; TEBALDI, V. M. R. Inhibitory activity of *Syzygium aromaticum* and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.essential oils against *Listeria monocytogenes* inoculated in bovine ground meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 357-365, 2013.

OLIVEIRA, T. A.; AROUCHA, E. M. M; SOUZA, M. S.M.; LEITE, R. H. L.; SANTOS, F. K. G. Efeito do biofilme de gelatina e cloreto de cálcio na coloração de quiabo armazenado sob refrigeração. **Revista Agropecuária Científica no Semiárido-ACSA**, v. 8, n. 2, p. 07-11, 2012.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. Porto Alegre: Artmed, v. 2, 280 p., 2005.

PAIVA, L. B.; GUIMARÃES, T. R.; MORALES, A. R. Propriedades Mecânicas de Nanocompósitos de Polipropileno (PP) e Montmorilonita Organofílica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 16, n° 2, p. 136-140, 2006.

PARENTE, L. S.; COSTA, R. A.; VIEIRA, G. H. F.; REIS, E. M. F.; HOFER, E.; FONTELES, A. A.; VIEIRA, R. H. S. F Bactérias entéricas presentes em amostras de água e camarão marinho *Litopenaeus vannamei* oriundos de fazendas de cultivo no Estado do Ceará, Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 48, n. 1, p. 46-53, 2011.

PASTOR C.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ L.; CHÁFER M.; CHIRALT M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p.1174–1183, 2010.

PEELMAN, N.; RAGAERT, P.; MEULENAER, B.; ADONS D.; PEETERS, R.; CARDON, L.; IMPE, F. V.; DEVLIEGHERE, F. Application of bioplastics for food packaging. Review Article: **Trends in Food Science & Technology**, v. 32, n. 22, p. 128-141, 2013.

PELISSARI, F. M.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F.; PINEDA, E. A.G. Antimicrobial, Mechanical, and Barrier Properties of Cassava Starch-Chitosan Films Incorporated with Oregano Essential Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 16, 2009.

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

PIZATO, S.; CORTEZ-VEGA, W. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; BORGES, C. D. Efeito da aplicação de diferentes revestimentos comestíveis na conservação de maçãs Royal Gala minimamente processadas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 253-264, 2013.

PLÁCIDO, G. R. **Extração, caracterização e uso da queratina de penas de frango para a obtenção de filmes biodegradáveis**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-

Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. 128 p., 2007.

PUGA-LÓPEZ, D.; PONCE-PALAFOX, J. T.; BARBA-QUINTERO, G. M.; TORRES-HERRERA, R.; ROMERO-BELTRÁN, E.; FIGUEROA, J. L. A. A Comparative Study of Physico-Chemical, Proximate Composition and Microbiological Muscle Properties, in Two Species Shrimps of the Pacific Tropical Coast. **Journal of Agricultural Science and Applications** , v. 2, n. 3, p. 151-154, 2013.

QI, H.; HU, W.; JIANG, A.; TIAN, M. Extending shelflife of fresh-cut Fuji apples with chitosan coatings. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 12, n. 1, p. 62-66, 2011.

RABELLO, M. S. **Aditivação de polímeros**, Editora: Artliber, São Paulo, 242 p., 2000.

RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G. Conformational and rheological changes in catfish myosin during alkali-induced unfolding and refolding. **Food Chemistry**, 107, p. 385 - 398, 2008.

RAWDKUEN, S.; SAIUT, S.; KHAMSORN, S.; CHAIJAN, M.; S. BENJAKUL. Biochemical and Gelling Properties of Tilapia Surimi and Protein Recovered Using Acid-Alkaline Process. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 112- 119, 2009.

REBOUÇAS, M. C.; RODRIGUES, M. C. P.; CASTRO, R. J. S.; VIEIRA, J. M. M. Caracterização do concentrado protéico de peixe obtido a partir da filetagem de tilápia do Nilo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, n.2, p. 697-704, 2012.

REGENSTEIN, J. M.; JAUREGUI, C. A.; BAKER, R. The effect of pH, polyphosphates and different salt on water retention properties of ground trout muscle, **Journal of Food Biochemistry**, v. 8, p. 123-131, 1984.

REHDER, V.L.G.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C.; SARTORATTO, A.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.2, p.67-71, 2004.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 1ª Ed. Campinas, SP: Editora Casa do Pão, 326 p., 2005.

ROCHA, M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de filmes protéicos a base de anchoita (*Engraulis anchoita*) incorporados com ácidos orgânicos**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande-FURG, 144 p., 2012.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; GONZÁLES-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A.; CHÁFER, M. Physical and antimicrobial properties of chitosan-tea tree essential oil composite films. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 4, p. 443-452, 2010.

SEABRA, L. M. J.; DAMASCENO, K. S. F. S. C.; ANDRADE, S. A. C.; DANTAS, M. M. G.; SOARE, S. N. K. M.; PEDROSA, L. F. C. Effect of rosemary on the quality characteristics of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal Food Quality**, v. 34, p. 363-369, 2011.

SANTOS, E. B.; FRANCO, R. M.; MÁRSICO, E. T.; MANTILLA, S. P. S.; NASCIMENTO, E. R.; CUNHA, F. L.; SILVA, A. C.; JÚNIOR, C. A. Influência das condições de comercialização do camarão cru descascado resfriado sob os parâmetros físico-químicos e bacteriológicos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.35, n. 2, p. 133-139, 2013.

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

SANTOS, S. C.; FERREIRA, F. S.; DAMIÃO, A. O.; BARROS, T. F.; ROSS-ALVA, J. C.; FERNANDEZ, L. G. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de *Avicennia schaueriana* Stapt & Leechm. ex Moldenke, Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 124-129, 2010.

SATHIVEL, S.; BECHTEL, P. "Properties of Soluble Protein Powders from Alaska Pollock (*Theragra chalcogramma*)," **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 5, p. 520-529, 2006.

SATHIVEL, S.; BECHTEL, P.; BABBITT, W. P.; NESGULESCU, I. I.; REPPOND, K. Properties of Protein Powders from Arrowtooth Flounder (*Atheresthes stomias*) and Herring (*Clupeaharengus*) Byproducts, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 16, p. 5040- 5046, 2004.

SHABARINATH, S.; KUMAR, H. S.; KHUSHIRAMANI, R.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Detection and characterization of *Salmonella* associated with tropical seafood. **Journal Food Microbiology**, v. 33, p.114:227, 2007.

SILVA, N. C. C.; BARBOSA, L.; SEITO, L. N.; JUNIOR, A. F. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. **Natural Product Research**. v. 26, n. 16, p. 1510-1514, 2012.

SOBRAL, P. J. A.; SANTOS, J. S.; GARCIA, F. T. Effect of protein and plasticizer concentrations in film forming solutions on physical properties of edible films based on muscle proteins of a Thai Tilapia. **Journal of Food Engineering**, v. 70, p. 93–100, 2005.

SOBRAL, P. J. A. Influência da espessura sobre certas propriedades de biofilmes à base de proteínas miofibrilares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.1251-1259, 2000.

SOUSA, G. M. **Desenvolvimento de filmes biodegradáveis ativos e aplicação na conservação de massa alimentícia fresca**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás - UFG, 89 p., 2012.

SOUZA, S. M. S.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C. Propriedades físicas de filmes comestíveis a base de proteínas miofibrilares de carne bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, n.1, p.283-296, 2012.

SOUZA, V. C.; MONTE, M. L.; PINTO, L. A. A. Preparation of biopolymer film from chitosan modified with lipid fraction. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 9, p. 1856–1862, 2011.

SOUZA, J. F.; BITENCOURT, N. N.; GOMES, C. S.; OLIVEIRA, J. K.; SANTOS, R. M.; REIS, I. A. O.; NUNES, M. L.; NARAIN, N. Desenvolvimento e caracterização

físico-química e sensorial de nuggets formulados com concentrado proteico de pescado - MARINE BEEF. **Scientia Plena**, v. 6, n. 03, 2010.

SOUZA, B. W. S. **Characterisation of new hydrocolloids to be used as food coatings and integration of their application with ohmic heating**. Tese de Doutorado em Engenharia Química e Biológica. Universidade do Minho, Escola de Engenharia, 181 p., 2010.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N.; FILHO, J. M. B. Orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae): Uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n.132, p.40-45, 2005.

SOUZA, S. M. S. de; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C. Extração de proteínas miofibrilares de carne bovina para elaboração de filmes comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.4, p. 619-626, 2004.

TADPITCHAYANGKOON, P.; PARK, J. W.; YONGSAWATDIGUL, J. Conformational changes and dynamic rheological properties of fish sarcoplasmic proteins treated at various pHs, **Food Chemistry**, v. 121, p.1046-1052, 2010.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. Trends in **Food Science and Technology**, v.14, n.3, p. 71–78, 2003.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Roles of Lipid Oxidation and pH on Properties and Yellow Discolouration during Storage of film from Red Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Muscle Protein, **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 3, p. 426-433, 2011.

VARELTZIS, K. Fish proteins from unexploited and underdeveloped sources. In G. Doxastakis & V. Kiosseoglou (Eds.), *Novel macromolecules in food systems*, Amsterdam: **Elsevier**, p. 133 - 159, 2000.

VARGAS, M.; PASTOR, C.; CHIRALT, A.; MCCLEMENTS, D. J.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Recent Advances in Edible Coatings for Fresh and Minimally Processed Fruits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 48, n. 6, p. 496-511, 2008.

VENUGOPAL, V. Seafood proteins: Functional properties and protein supplements. Marine products for healthcare: Functional and bioactive nutraceutical compounds from the ocean. Boca Raton: **CRC Press**, p. 51-102, 2009.

VIDAL, J. M. A. **Utilização da filetagem de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) na obtenção de concentrado proteico de peixe: Caracterização físico-química e aceitação sensorial.** Dissertação de Mestrado em tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Ceará, 110 p., 2007.

VIDAL, J. M. A.; RODRIGUES, M. C. P.; ZAPATA, J. F. F.; VIEIRA, J. M. M. Concentrado proteico de resíduos da filetagem de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*): caracterização físico-química e aceitação sensorial. **Revista Ciências Agronômicas**, v. 42, Nº 1, p. 92-99, 2011.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Foodborne disease outbreaks : guidelines for investigation and control.** Switzerland, 145 p., 2008.

ZAVAREZE, E. R. **Aplicação de hidrolisado proteico com peptídeos bioativos nanoencapsulados em filmes elaborados a partir de proteínas de pescado.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande-FURG, 104 p., 2012.

ZAVAREZE, E. R.; HALAL, S. L. M.; TELLES, A. C.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Filmes biodegradáveis à base de proteínas miofibrilares de pescado. **Brazil Journal Food Technology**, p. 53-57, 2012.

ZIVANOVIC, S.; CHI, S.; DRAUGHON, A. F. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, n. 1, p. 45–51. 2005.