



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

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE FILMES A PARTIR DE QUITOSANA  
OBTIDA POR PROCESSO MISTO UTILIZANDO SUBPRODUTOS INDUSTRIAIS DO  
CARANGUEJO VERMELHO

HELENA LEÃO GOUVEIA COSTA

Prof. Dr. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ  
Orientador

Dra. MERITAINE DA ROCHA  
Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2019



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

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE FILMES A PARTIR DE QUITOSANA  
OBTIDA POR PROCESSO MISTO UTILIZANDO SUBPRODUTOS INDUSTRIAIS DO  
CARANGUEJO VERMELHO

HELENA LEÃO GOUVEIA COSTA

Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do  
título de mestre em Engenharia e  
Ciência de Alimentos.

Prof. Dr. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ  
Orientador

Dra. MERITAINE DA ROCHA  
Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2019

## Ficha catalográfica

C837d Costa, Helena Leão Gouveia.

Desenvolvimento e aplicação de filmes a partir de quitosana obtida por processo misto utilizando subprodutos industriais do caranguejo vermelho / Helena Leão Gouveia Costa. – 2019.  
183 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2019.

Orientador: Dr. Carlos Prentice-Hernández.

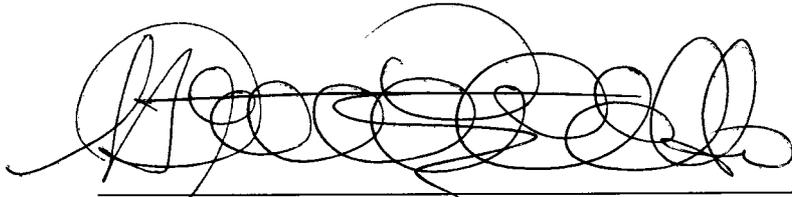
Coorientadora: Dra. Meritaine da Rocha.

1. Aproveitamento de Resíduos 2. Desproteínização Enzimática  
3. Desmineralização Fermentativa 4. Desacetilação Química  
5. Filmes Ativos I. Prentice-Hernández, Carlos II. Rocha, Meritaine da  
III. Título.

CDU 565.3

## APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Helena Leão Gouveia Costa e aprovada em 20 de março de 2019, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



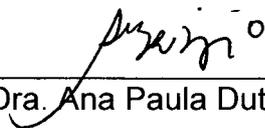
Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández – FURG



Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert - FURG



Profa. Dra. Myriam de las Mercedes Salas-Mellado - FURG



Profa. Dra. Ana Paula Dutra Resem Brizio - FURG



Profa. Dra. Simone Hickmann Flôres - UFRGS



Dedico aos meus pais, Waldo Antonio e Irma Helena, a minha avó Leda e meu marido Aluizio Junior por nunca terem medido esforços para que eu chegasse até aqui, pelo amor, carinho e incentivo nos momentos difíceis.



## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, por me conceder saúde, por todas as bênçãos, oportunidades e, principalmente, pela força que manteve firme em todas as dificuldades.

Aos meus pais Waldo e Irma, por tudo que enfrentaram para que eu chegasse até aqui. Sou muito abençoada por todo amor, carinho e incentivo que vocês sempre me deram. Obrigada principalmente por toda compreensão, por acreditarem e apoiarem as minhas escolhas. Amo muito vocês!

Ao meu marido e companheiro incansável Aluizio Junior, obrigada por tudo. Teu apoio foi fundamental em cada etapa, assim como em cada momento desde que nos conhecemos. Tu és meu porto seguro e sigo na batalha por nós dois! Te amo muito!

À minha avó Leda, por todos os momentos que não mediu esforços para me auxiliar, por todo auxílio durante toda minha criação, assim como meu avô Malik. Obrigada por estar sempre torcendo por mim e me esperando de braços abertos quando eu preciso.

Aos meus avós Vanir e João e novamente ao meu avô Malik, pois sei que iluminam o meu caminho, me olhando com carinho e felizes por mim onde estiverem.

Ao meu orientador Carlos Prentice-Hernández, pela oportunidade e orientação para que fosse possível o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por toda compreensão, apoio, incentivo e conhecimento transmitidos. Tenho muita admiração pelo seu trabalho e é uma honra ser sua orientada. Obrigada por tudo professor!

À minha coorientadora Meritaine da Rocha, que não mediu esforços para me ajudar em todas as dificuldades durante esta caminhada, pelos “puxões de orelha”, que sem os quais, eu não teria chego até aqui, pela paciência, por todo apoio, carinho e incentivo. Grata a ti por tudo, principalmente por todo aprendizado!

A todos os alunos de iniciação científica do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), em especial, Caio, Carolina e Luciane por toda ajuda nos experimentos, disponibilidade e amizade. Luciane, minha ajudante oficial, obrigada por todo apoio e palavras de conforto, principalmente, no início do trabalho. Tens grande potencial, menina! Caio, sem palavras para te agradecer por tudo, tu és um menino de coração muito bom. Estarei torcendo sempre por ti e tenho certeza que teu futuro será incrível!

A todos os colegas que passaram pelo LTA nesses dois anos do meu mestrado, pois todos de alguma maneira contribuíram no trabalho auxiliando no esclarecimento de dúvidas, apoiando e confortando quando necessário. Em especial, agradeço: ao Alan, amigo de quem sinto muita falta; a Camila, por toda ajuda e pelo empréstimo precioso do Caio; ao Cláudio, pelo

apoio na qualificação; a Dani, por ser minha companheira nessa jornada, sempre com palavras positivas; ao Gabriel, por ter sido meu parceiro no primeiro ano; a Andressa, Gislaíne, Paola e Sibeles, de quem me aproximei nesse segundo ano, sempre me confortando e incentivando quando foi preciso.

Aos técnicos do Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Aline Massia e Raphael Trombetta, por todo auxílio e disposição em tudo que foi preciso, super atenciosos e prestativos.

Obrigada por tudo!

À minha amiga Taís Barcelos Goulart, companheira sem igual neste último ano. Obrigada por compartilhar comigo minhas alegrias, minhas tristezas e preocupações. Obrigada por ser esta pessoa iluminada que faz tão bem! Contigo tudo ficou mais fácil, desde as viagens até os problemas da vida! Grata a ti para sempre!

À minha cunhada Giovana Costa Tuerlinckx, grande amiga, por toda torcida e orações. Tu és exemplo de mulher guerreira para mim! Obrigada por tudo!

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da FURG, por todo conhecimento repassado e disponibilidade em ajudar, em especial a professora Myriam de las Mercedes Salas-Mellado, por todos os ensinamentos e momentos compartilhados na convivência no LTA.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Região Sul (CEME-Sul), pela disponibilização dos equipamentos para a realização da análise de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Centro Integrado de Análises (CIA), pela disponibilização dos equipamentos para a realização da análise de Ressonância Magnética Nuclear.

A empresa *World Fish*, por me ceder à matéria-prima utilizada neste estudo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro a este trabalho de dissertação - Código de Financiamento 001.

A Universidade Federal do Rio Grande, por me proporcionar crescimento e conhecimento.

A todos, MUITO OBRIGADA!

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA

<b>Tabela 1</b> – Composição química média apresentada por diferentes subprodutos marinhos .....	38
<b>Tabela 2</b> – Fontes naturais de quitina .....	39
<b>Tabela 3</b> – Filmes naturais aplicados como embalagem de alimentos .....	58

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO I - CARACTERIZAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA OBTIDAS POR PROCESSO MISTO A PARTIR DOS EXOESQUELETOS DO CARANGUEJO VERMELHO (*Chaceon notialis*);

<b>Tabela 1</b> – Composição proximal dos exoesqueletos de caranguejo vermelho .....	79
<b>Tabela 2</b> – Composição proximal da quitina obtida dos exoesqueletos do caranguejo vermelho .....	83
<b>Tabela 3</b> – Composição proximal da quitosana .....	84
<b>Tabela 4</b> – Parâmetros de cor da carapaça moída, quitina e quitosana .....	85
<b>Tabela 5</b> – Avaliação visual da solubilidade dos polímeros .....	86
<b>Tabela 6</b> – Calorimetria diferencial de varredura (DSC) para quitina e quitosana produzida .....	88
<b>Tabela 7</b> – Atividade antimicrobiana da quitosana produzida .....	93

ARTIGO II - EFEITO DE FILMES BIOATIVOS À BASE DE QUITOSANA NA CONSERVAÇÃO DE FILÉS DE PEITO DE FRANGO

<b>Tabela 1</b> – Propriedades dos filmes à base de quitosana em diferentes concentrações .....	117
<b>Tabela 2</b> – Calorimetria diferencial de varredura dos filmes à base de quitosana .....	123
<b>Tabela 3</b> – Atividade antimicrobiana dos filmes à base de quitosana .....	125
<b>Tabela 4</b> – Avaliação da cor dos filés de frango em diferentes condições de embalagem durante o armazenamento refrigerado .....	129

## APÊNDICE II

<b>Tabela 1</b> – Avaliação subjetiva dos filmes .....	179
--	-----

## APÊNDICE III

<b>Tabela 1</b> – Análise estatística da determinação de pH .....	181
<b>Tabela 2</b> – Análise estatística da determinação da força de cisalhamento .....	181
<b>Tabela 3</b> – Análise estatística da determinação da estabilidade lipídica (TBARS) .....	181
<b>Tabela 4</b> – Análise estatística da determinação da perda de massa .....	182
<b>Tabela 5</b> – Análise estatística da contagem de Enterobactérias (Log UFC/g) .....	182
<b>Tabela 6</b> – Análise estatística da contagem de Bactérias ácido lácticas (Log UFC/g) .....	182
<b>Tabela 7</b> – Análise estatística da contagem de Mesófilos aeróbios totais (Log UFC/g) .....	183
<b>Tabela 8</b> – Análise estatística da contagem de <i>Pseudomonas</i> spp. (Log UFC/g) .....	183
<b>Tabela 9</b> – Análise estatística da contagem de Psicrotróficos (Log UFC/g) .....	183

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA

<b>Figura 1</b> – Caranguejo vermelho .....	35
<b>Figura 2</b> – Barco fatoria da empresa e processamento do caranguejo .....	36
<b>Figura 3</b> – Comparação entre a estrutura química da celulose (1) e da quitina (2) .....	39
<b>Figura 4</b> – Organização estrutural da quitina e demais constituintes .....	41
<b>Figura 5</b> – Comparação entre a estrutura química da quitina (1) e da quitosana (2) .....	42
<b>Figura 6</b> – Produção de quitina e quitosana por processos químicos e biotecnológicos .....	44
<b>Figura 7</b> – Esquema do mecanismo de hidrólise alcalina da quitina para produção de quitosana .....	46
<b>Figura 8</b> – Mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana .....	52

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO I - CARACTERIZAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA OBTIDAS POR PROCESSO MISTO A PARTIR DOS EXOESQUELETOS DO CARANGUEJO VERMELHO (*Chaceon notialis*);

<b>Figura 1</b> – Fluxograma operacional do processo de recuperação de quitina e quitosana .....	72
<b>Figura 2</b> – Cinética da hidrólise para a etapa de desproteínização dos exoesqueletos do caranguejo vermelho .....	80
<b>Figura 3</b> – Processo fermentativo para desmineralização dos exoesqueletos do caranguejo vermelho .....	81
<b>Figura 4</b> – Avaliação visual da solubilidade da quitina (A) e da quitosana (B) .....	86
<b>Figura 5</b> – Microscopia eletrônica de varredura da quitina (A-B) e da quitosana (C-D) .....	87
<b>Figura 6</b> – Espectros de absorção da região do infravermelho da quitina (A) e quitosana (B) .....	90
<b>Figura 7</b> – Análise termogravimétrica (TGA) da quitina (A) e da quitosana (B) .....	91
<b>Figura 8</b> – Espectro de RMN- <sup>1</sup> H para a amostra de quitosana .....	92
<b>Figura 9</b> – Avaliação da atividade antimicrobiana em diferentes concentrações de quitosana .....	93

ARTIGO II - EFEITO DE FILMES BIOATIVOS À BASE DE QUITOSANA NA CONSERVAÇÃO DE FILÉS DE PEITO DE FRANGO

<b>Figura 1</b> – Filés de frango revestidos pelos filmes à base de quitosana .....	113
---	-----

<b>Figura 2</b> – Filmes à base de quitosana nas concentrações (A) 1, (B) 1,5 e (C) 2% (m/v) .....	118
<b>Figura 3</b> – Microscopia eletrônica de varredura dos filmes à base de quitosana (A) 1, (B) 1,5 e (C) 2% (m/v) .....	122
<b>Figura 4</b> – Análise termogravimétrica dos filmes à base de quitosana .....	124
<b>Figura 5</b> – Atividade antimicrobiana dos filmes à base de quitosana na concentração 2% (m/v) .....	126
<b>Figura 6</b> – Comportamento do pH dos filés de peito de frango em diferentes condições de embalagem .....	127
<b>Figura 7</b> – Perda de massa dos filés de peito de frango nas diferentes condições de embalagem durante o armazenamento a 4 °C .....	130
<b>Figura 8</b> – Avaliação da estabilidade lipídica dos filés de peito de frango em diferentes condições de embalagem pelo método TBARS .....	132
<b>Figura 9</b> – Força de cisalhamento (FC) para avaliação instrumental da textura dos filés de peito de frango em diferentes condições de embalagem .....	133
<b>Figura 10</b> – Contagem de mesófilos aeróbios totais nos filés de peito de frango em diferentes condições de embalagem .....	135
<b>Figura 11</b> – Contagem de <i>Pseudomonas</i> spp. nos filés de peito de frango em diferentes condições de embalagem .....	136
<b>Figura 12</b> – Contagem de bactérias ácido láticas nos filés de peito de frango em diferentes condições de embalagem .....	137
<b>Figura 13</b> – Contagem de enterobactérias nos filés de peito de frango em diferentes condições de embalagem .....	138
<b>Figura 14</b> – Contagem de bactérias psicrótróficas nos filés de peito de frango em diferentes condições de embalagem .....	139

## APÊNDICE I

<b>Figura 1</b> – Cinética da hidrólise enzimática para a desproteinização dos exoesqueletos de caranguejo vermelho com enzima Protamex .....	177
---	-----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Abs 600 – Absorbância a 600 nm

AL – Ácido lático

ANOVA – Análise de variância

ASTM - *American Society for Testing and Materials*

ATCC – *American Type Culture Collection*

BALs – Bactérias produtoras de ácido lático

B – Volume da base consumida

BHI – *Brain Heart Infusion*

BVVG – Ágar Bile Vermelho Violeta Glicose

b.s – Base seca

b.u – Base úmida

DM – Desmineralização

DP – Desproteínização

DSC – Calorimetria diferencial de varredura

DTAs – Doenças transmitidas por alimentos

ER – Elongação até a ruptura

E/S – Proporção enzima por substrato proteico

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FT-IR – Espectroscopia no infravermelho

F1 – Filmes à base de quitosana na concentração 1% (m/v), em base a ácido acético

F1.5 – Filmes à base de quitosana na concentração 1,5 (m/v), em base a ácido acético

F2 – Filmes à base de quitosana na concentração 2 (m/v), em base a ácido acético

GA – Grau de acetilação

GH – Grau de hidrólise

GLcN – Glicosamina

GLcNAc – N-acetil-glicosamina

htot – Número de ligações peptídicas

$L^*$  - Luminosidade

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDA - Malonaldeído

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MM – Massa molar

MP – Massa de proteína

MRS – *Man, Rogosa e Sharpe*

NaOH – Hidróxido de sódio

Nb – Normalidade corrigida da base

P – Filés embalados com filmes de polietileno

PCA – Ágar padrão para contagem

pH – Potencial hidrogeniônico

pka – Constante de dissociação

PV – Filés embalados com filmes de polietileno e vácuo

PVA – Permeabilidade ao vapor de água

Q – Filés embalados com filmes de quitosana na concentração 2% (m/v)

QV – Filés embalados com filmes de quitosana e vácuo

RMN-<sup>1</sup>H – Ressonância magnética nuclear

RT – Resistência a tração

T – Temperatura

Tfinal – Temperatura final

Tinício – Temperatura de início

Tpico – Temperatura de pico

TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TGA – Análise termogravimétrica

UBAEF – União Brasileira de Avicultura

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UR – Umidade relativa

x – Espessura dos filmes

Y – Opacidade dos filmes

Y<sub>b</sub> – Opacidade no padrão branco

Y<sub>p</sub> – Opacidade no padrão preto

α – Grau de dissociação

η – Viscosidade intrínseca

ΔH – Entalpia

%GD – Grau de desacetilação



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>21</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>27</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>33</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>35</b>
3.1 CARANGUEJO VERMELHO ( <i>Chaceon notialis</i> ) .....	35
3.2 SUBPRODUTOS INDUSTRIAIS DE CRUSTÁCEOS .....	37
3.3 QUITINA .....	38
3.4 QUITOSANA .....	41
3.5 PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA .....	43
3.5.1 Processo químico .....	45
3.5.2 Processo biotecnológico .....	46
3.6 PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DA QUITINA E QUITOSANA .....	50
3.6.1 Atividade antimicrobiana .....	51
3.7 FILMES POLIMÉRICOS E EMBALAGENS ATIVAS .....	54
3.7.1 Aplicação de filmes de quitosana em alimentos .....	56
3.7.1.1 Carne de frango .....	57
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>61</b>
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>63</b>
ARTIGO I – CARACTERIZAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA OBTIDAS POR PROCESSO MISTO A PARTIR DOS EXOESQUELETOS DO CARANGUEJO VERMELHO ( <i>Chaceon notialis</i> ) .....	65
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>70</b>
2.1 MATERIAL .....	70
2.1.1 Caranguejo vermelho .....	70
2.1.2 Enzimas, micro-organismos e reagentes .....	71
2.2 RECUPERAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA POR PROCESSO MISTO .....	71
2.3 CARACTERIZAÇÃO .....	75
2.3.1 Composição proximal .....	75
2.3.2 Cor .....	75
2.3.3 Solubilidade .....	75
2.3.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) .....	75
2.3.5 Análise termogravimétrica (TGA) .....	76
2.3.6 Espectroscopia no infravermelho (FT-IR) .....	76
2.3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	76
2.3.8 Massa molar .....	77
2.3.9 Grau de desacetilação .....	77
2.3.10 Ressonância magnética nuclear (RMN- <sup>1</sup> H) .....	77
2.4 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE .....	78

<b>2.4.1 Atividade antimicrobiana</b> .....	<b>78</b>
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	78
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>79</b>
3.1 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DOS EXOESQUELETOS DE CARANGUEJO VERMELHO .....	79
3.2 QUITINA .....	80
<b>3.2.1 Desproteíntização dos exoesqueletos de caranguejo vermelho</b> .....	<b>80</b>
<b>3.2.2 Desmineralização dos exoesqueletos de caranguejo vermelho</b> .....	<b>81</b>
<b>3.2.3 Composição proximal da quitina</b> .....	<b>82</b>
3.3 QUITOSANA .....	83
<b>3.3.1 Composição proximal, massa molar e grau de desacetilação</b> .....	<b>83</b>
3.4 CARACTERIZAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA .....	85
<b>3.4.1 Cor</b> .....	<b>85</b>
<b>3.4.2 Solubilidade</b> .....	<b>86</b>
<b>3.4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</b> .....	<b>87</b>
<b>3.4.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)</b> .....	<b>88</b>
<b>3.4.5 Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)</b> .....	<b>89</b>
<b>3.4.6 Análise termogravimétrica (TGA)</b> .....	<b>90</b>
<b>3.4.7 Ressonância magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H)</b> .....	<b>91</b>
<b>3.4.8 Atividade antimicrobiana</b> .....	<b>92</b>
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	<b>94</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>95</b>

ARTIGO II - EFEITO DE FILMES BIOATIVOS À BASE DE QUITOSANA NA CONSERVAÇÃO DE FILÉS DE PEITO DE FRANGO .....	103
---	-----

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>107</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>108</b>
2.1 MATERIAL .....	108
<b>2.1.2 Micro-organismos e reagentes</b> .....	<b>108</b>
2.2 DESENVOLVIMENTO DOS FILMES .....	109
<b>2.2.1 Caracterização dos filmes</b> .....	<b>109</b>
2.2.1.1 Espessura .....	109
2.2.1.2 Propriedades mecânicas .....	109
2.2.1.3 Permeabilidade ao vapor de água .....	110
2.2.1.4 Solubilidade em água e intumescimento .....	110
2.2.1.5 Cor, opacidade e transparência .....	111
2.2.1.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	112
2.2.1.7 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) .....	112
2.2.1.8 Análise termogravimétrica (TGA) .....	112
2.3 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE .....	113
<b>2.3.1 Atividade antimicrobiana</b> .....	<b>113</b>
2.4 USO DE FILMES BIOATIVOS NA CONSERVAÇÃO DE FILÉS DE PEITO DE FRANGO .....	113
<b>2.4.1 Avaliação nos filés de peito de frango</b> .....	<b>114</b>
2.4.1.1 Perda de massa .....	114
2.4.1.2 Força de cisalhamento .....	114
2.4.1.3 pH .....	115
2.4.1.4 Cor .....	115
2.4.1.5 Estabilidade lipídica (TBARS) .....	115

2.4.1.6 Análises microbiológicas .....	115
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	116
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>116</b>
3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES .....	116
3.1.1 Espessura e propriedades mecânicas (RT e ER) .....	118
3.1.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA) .....	119
3.1.3 Solubilidade em água e intumescimento .....	120
3.1.4 Cor, opacidade e transparência .....	121
3.1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	122
3.1.6 Propriedades térmicas .....	123
3.2 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE .....	125
3.2.1 Atividade antimicrobiana .....	125
3.3 EFEITO DO USO DE FILMES BIOATIVOS NA CONSERVAÇÃO DOS FILÉS DE PEITO DE FRANGO .....	126
3.3.1 pH .....	126
3.3.2 Cor .....	128
3.3.3 Perda de massa .....	130
3.3.4 Estabilidade lipídica (TBARS) .....	131
3.3.5 Força de cisalhamento .....	132
3.3.6 Análises microbiológicas .....	134
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>139</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>140</b>
<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>147</b>
<b>4 CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>149</b>
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>151</b>
<b>5 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>153</b>
<b>CAPÍTULO VI .....</b>	<b>155</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>157</b>
<b>APÊNDICE I .....</b>	<b>177</b>
<b>APÊNDICE II .....</b>	<b>179</b>
<b>APÊNDICE III .....</b>	<b>181</b>



## **CAPÍTULO I**

**RESUMO GERAL, GENERAL ABSTRACT, INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS**



## RESUMO GERAL

O processamento de crustáceos gera grande quantidade de resíduos que, em geral, são subvalorizados ou descartados indevidamente. Estes resíduos podem ser reaproveitados como subprodutos industriais ricos em compostos de interesse, tais como a quitina e seu derivado funcional, a quitosana. Além disso, muitas pesquisas têm sido realizadas para produzir quitina e quitosana utilizando processos biotecnológicos, buscando uma tecnologia limpa que produz compostos com maior qualidade. O objetivo geral do presente trabalho foi estudar a obtenção, associando processo biotecnológico ao químico, de quitina e quitosana a partir dos exoesqueletos do caranguejo *Chaceon notialis*, sendo a quitosana utilizada para a elaboração e aplicação de filmes ativos na conservação de filés de peito de frango. Primeiramente, os exoesqueletos de caranguejo triturados foram desproteinizados por hidrólise enzimática utilizando a enzima Alcalase, seguido da desmineralização por fermentação com *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 para a obtenção de quitina. A seguir, a quitina obtida foi submetida à desacetilação química, para a produção de quitosana, utilizando hidróxido de sódio (40% m/v). Os polímeros foram caracterizados quanto à composição proximal, cor, solubilidade, espectroscopia no infravermelho, calorimetria diferencial de varredura, análise termogravimétrica e microscopia eletrônica de varredura. A fim de verificar suas propriedades bioativas, a quitosana foi avaliada em *in vitro* quanto à sua atividade antimicrobiana pelo método disco-difusão frente a dois micro-organismos *Escherichia coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus* nas concentrações 1; 2 e 4 mg/mL, além da avaliação da sua massa molar e grau de desacetilação. Então, foram desenvolvidos filmes à base de quitosana nas concentrações de 1; 1,5 e 2% (m/v), em base a solução de ácido acético 1% (v/v), e caracterizados às propriedades físico-químicas, mecânicas, de barreira, morfológicas e atividade antimicrobiana. Os filmes na concentração com maior potencial antimicrobiano e melhores propriedades mecânicas foram avaliados quanto ao uso como embalagens ativas para filés de peito de frango. Quatro condições de embalagem foram estudadas, sendo elas: filme de polietileno (P), filme de quitosana (Q), filme de quitosana e vácuo (QV) e filme de polietileno e vácuo (PV). O acompanhamento da vida útil dos filés foi realizado através de análises físico-químicas (cor, pH, força de cisalhamento, perda de massa e estabilidade lipídica) e microbiológicas (bactérias ácido lácticas, enterobactérias, mesófilos, psicrotróficos e *Pseudomonas* spp.) durante 10 dias de armazenamento de 4 °C. Dentre os principais resultados deste trabalho, destaca-se a eficiência de remoção dos bioprocessos empregados para a obtenção de quitina, pois reduziram o conteúdo de proteínas e minerais em 88,31% e 91,68%, respectivamente. A quitosana produzida apresentou grau de desacetilação de 80,17% e massa molar de 192 kDa, possuindo propriedades semelhantes à literatura. Os filmes elaborados com 2% de quitosana apresentaram resistência a tração e alongação até ruptura de 19,79 MPa e 22,58%, superior ao verificado para as demais concentrações testadas. Além disso, apresentaram atividade antimicrobiana frente à *S. aureus*, sendo esses filmes escolhidos como melhor tratamento para a aplicação como filmes ativos. Em relação aos filés de peito de frango, quando revestidos com os filmes de quitosana e filmes de quitosana e vácuo, apresentaram menor multiplicação microbiana do grupo de micro-organismos testados, manutenção do pH e redução da oxidação lipídica. Entretanto, devido a elevada permeabilidade ao vapor de água e capacidade de intumescimento dos filmes, os filmes de quitosana (Q) comprometeram a aparência visual dos filés, o que influenciou diretamente na sua aceitabilidade.

Palavras-chave: Aproveitamento de resíduos. Desproteínização enzimática. Desmineralização fermentativa. Desacetilação química. Filmes ativos.



## GENERAL ABSTRACT

### **Development and application of films from chitosan obtained by a joint process using industrial by-products of the red crab**

The processing of crustaceans generate a large amount of waste that is generally undervalued or improperly discarded. These industrial residues can be reused since they are rich in valuable compounds, such as chitin and its functional derivative, chitosan. In addition, many researches have been carried out to produce chitin and chitosan using biotechnological processes, in order to use a clean technology that produces higher quality compounds. The general objective of the present work was to study the production, associating the biotechnological and chemical processes, of chitin and chitosan from the exoskeletons of the red crab (*Chaceon notialis*), being the chitosan used for the elaboration and application of active films in the conservation of chicken breast. The crushed crab shells were deproteinized by enzymatic hydrolysis using the Alcalase enzyme, followed by demineralization by fermentation with *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 to obtain chitin. The chitin obtained was submitted to chemical deacetylation for the production of chitosan using sodium hydroxide (40% w/v). The polymers were characterized by proximal composition, color, solubility, infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry, thermogravimetric analysis and scanning electron microscopy. In order to verify its bioactive properties, chitosan was evaluated *in vitro* for its antimicrobial activity by the disc-diffusion method against two microorganisms *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* at concentrations 1; 2 and 4 mg/mL, besides the evaluation of its molecular weight and degree of deacetylation. The chitosan-based films were prepared at concentrations of 1; 1,5 and 2% (w/v), based on 1% acetic acid solution (v/v), and characterized by the physico-chemical, mechanical, barrier, morphological and antimicrobial properties. The films in the concentration with higher antimicrobial potential and better mechanical properties were used as active packages for chicken breast. Four packing conditions were studied: polyethylene film (P), chitosan film (Q), chitosan and vacuum film (QV) and polyethylene and vacuum film (PV). The monitoring of chicken breast shelf-life was performed through physico-chemical analyzes (color, pH, shear force, mass loss and lipid stability) and microbiological (lactic acid bacteria, enterobacteria, mesophiles, psychrotrophs and *Pseudomonas* spp.) during 10 days storage temperature of 4 °C. One of the main results of this work, was efficiency of removal of the bioprocesses used to obtain chitin, as they reduced the content of proteins and minerals by 88,31% and 91,68%, respectively. The chitosan produced had a degree of deacetylation of 80,17% and a molecular weight of 192 kDa, similar properties found in literature. The films made with 2% of chitosan presented tensile strength and elongation until rupture of 19,79 MPa and 22,58%, higher than that verified for the other concentrations tested. In addition, they presented antimicrobial activity against *S. aureus*, being these films chosen as the best treatment for the application as active films. In relation to chicken breast fillets, when coated with chitosan films and chitosan and vacuum films, they presented lower microbial multiplication of the group of microorganisms tested, maintenance of pH and reduction of lipid oxidation. However, due to the high permeability to water vapor and the swelling capacity of the films, the films compromised the visual appearance of the fillets, which directly influences their acceptability.

**Keywords:** Utilization of waste. Enzymatic deproteinization. Fermentative demineralization. Chemical deacetylation. Active Films.



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Os crustáceos estão entre os produtos marinhos mais rentáveis economicamente. Em 2016 foram processados cerca de 7,9 milhões de toneladas de crustáceos no mundo (FAO, 2018). O caranguejo vermelho (*Chaceon notialis*) é um crustáceo pertencente à família *Geryonidae*, que devido a sua carne adocicada apresenta elevado valor comercial. No Brasil, ele pode ser encontrado na cidade do Rio Grande/RS, sendo comercializado para diversos países da União Europeia (PINHEIRO; BOOS, 2016; VAN DER ELST; EVERETT, 2015).

A industrialização de crustáceos gera grandes quantidades de resíduos, tais como exoesqueletos, cabeças e vísceras, altamente perecíveis, pois somente cerca de 30% do peso da matéria-prima são considerados comestíveis. Sendo assim, quando descartados de forma inadequada, contribuem para a poluição ambiental, pois requerem condições especiais de tratamento e disposição, visto que apresentam características como elevado teor de nitrogênio e conteúdo mineral (YAN; CHEN, 2015). Em vista disso, há um crescente interesse de pesquisadores em alternativas ambientalmente adequadas para a utilização destes resíduos como matéria-prima na obtenção de produtos com alto valor agregado, tais como biopolímeros, hidrolisados proteicos e carotenoproteínas (ANTUNES-VALCAREGGI; FERREIRA; HENSE, 2017; ARANDAY-GARCÍA et al., 2017; DUN et al., 2019; HAMDI et al., 2018; HAMDI et al., 2019; LATORRES et al., 2018).

Os resíduos podem ser utilizados como subprodutos industriais do processamento de crustáceos, pois são constituídos por compostos bioativos que podem ser recuperados e aplicados, principalmente, na indústria alimentícia e farmacêutica (ANTUNES-VALCAREGGI; FERREIRA; HENSE, 2017). Os exoesqueletos dos crustáceos são constituídos por: (a) minerais (de 20 a 50%); (b) proteína (de 20 a 40%); e (c) quitina (de 15 a 40%). A quitina, um componente estrutural dos exoesqueletos, e a quitosana, derivada da desacetilação da quitina, são polissacarídeos que apresentam características diferenciadas como atoxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de propriedades biológicas, tais como atividade antimicrobiana, que as tornam atrativas para inúmeras aplicações (GOY et al., 2016; ÖZOGUL et al., 2018).

A obtenção desses polissacarídeos pode ser realizada por processos químicos ou biotecnológicos. Entretanto, os processos químicos, os quais são largamente utilizados pelas indústrias brasileiras, possuem desvantagens tais como: acentuada despolimerização, que provoca variações em propriedades e funcionalidades desses polímeros, bem como efeito poluente dos rejeitos do processo (LOPES et al., 2018). Em vista disso, é interessante que a

obtenção seja realizada por processos biotecnológicos, através de processos fermentativos e/ou enzimáticos, visando preservar a estrutura do polissacarídeo, devido ao controle da cinética de produção, com graus desejados de acetilação/desacetilação, reduzindo o uso de solventes, em relação às hidrólises ácida e/ou alcalina (LOPES et al., 2018; VÁZQUEZ et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

A quitosana poli ( $\beta$ -1,4-D-glicosamina), descrita como derivado funcional da quitina visto sua solubilidade em soluções ácido-aquosas, é um polissacarídeo catiônico, composto pela repetição de unidades de 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -(1,4)-D-glicosamina e 2-acetamida-2-desoxi- $\beta$ -(1,4)-D-glicosamina (ELSABEE; ABDU, 2013; ÖZOGUL et al., 2018). Devido ao seu grau de desacetilação e sua massa molar média, este polímero apresenta bioatividades diferenciadas, tais como: atividades antioxidante (ARANKU et al., 2018), antimicrobiana (ESCÁRCEGA-GALAZ et al., 2018), antitumoral (YOUNES et al., 2014), imunomoduladora (MORAN et al., 2018), cicatrizante (MURAKAMI et al., 2010), dentre outras. Ela tem despertado interesse devido ao potencial antimicrobiano, frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos, entre outros. Devido à carga positiva da quitosana, ela pode interagir facilmente com as membranas celulares microbianas (carregadas negativamente), levando a perda da viabilidade celular (MOUSAVI KHANEGHAH; HASHEMI; LIMBO, 2018).

O desenvolvimento de novos materiais para substituir polímeros sintéticos, que levam mais de cem anos para se degradarem no ambiente, tem se destacado como uma alternativa para diminuir o impacto ambiental causado pelo descarte destes. As embalagens tradicionais protegem o alimento do ambiente externo e fornecem informações acerca do produto. Uma tendência no desenvolvimento de embalagens de alimentos são as embalagens ativas. As embalagens ativas atuam aumentando a vida útil dos alimentos através da ação antimicrobiana e antioxidante, devido aos compostos bioativos presentes (MUJTABA et al., 2019; RHIM; PARK; HA, 2013). A quitosana pode ser aplicada como matriz polimérica para o desenvolvimento de embalagens ativas de alimentos, pois apresenta excelente capacidade de formação de filme, além das propriedades antioxidante e antimicrobiana (HOMEZ-JARA et al., 2018; PRIYADARSHI et al., 2018; ZOU et al., 2016). Os filmes de quitosana têm sido aplicados em diferentes alimentos. A carne de frango é altamente perecível durante o armazenamento sob refrigeração, devido às condições intrínsecas favoráveis para o crescimento de micro-organismos ou oriundos de contaminação durante o processamento, o que pode resultar em problemas econômicos e/ou relacionados com a saúde do consumidor (SOGUT;

SEYDIM, 2019), impulsionando estudos para aplicação de uma embalagem ativa nesse alimento.

Seguindo as linhas de pesquisa do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), pertencente a Escola de Química e Alimentos (EQA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), o desenvolvimento deste estudo visa agregar valor aos resíduos do processamento do caranguejo vermelho, capturado na cidade do Rio Grande e ainda pouco explorado cientificamente, recuperando através de processo misto um biopolímero de elevado interesse comercial que pode ser aplicado como matriz polimérica para embalagens de alimentos, na forma de filmes ativos. Em vista disso, o objetivo do presente trabalho foi estudar a associação de um processo biotecnológico ao químico para a obtenção de quitina e de quitosana a partir dos exoesqueletos do caranguejo vermelho (*Chaceon notialis*), sendo posteriormente a quitosana utilizada para a elaboração e aplicação em filmes ativos para a conservação de filés de peito de frango.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a associação de um processo biotecnológico ao químico para obtenção de quitina e quitosana a partir dos exoesqueletos do caranguejo vermelho (*Chaceon notialis*), sendo a quitosana posteriormente utilizada para o desenvolvimento e aplicação de filmes ativos para a conservação de filés de peito de frango.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter quitina, a partir das carapaças de caranguejo vermelho, através de processo biotecnológico (enzimático e fermentativo), e caracterizá-la quanto às suas propriedades físico-químicas, estruturais e térmicas;
- Produzir quitosana, a partir da desacetilação química da quitina, e caracterizá-la quanto às suas propriedades físico-químicas, estruturais e térmicas;
- Avaliar a atividade antimicrobiana apresentada pela quitosana frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas;
- Desenvolver filmes à base de quitosana e caracterizar quanto às suas propriedades morfológicas, mecânicas, físicas e de barreira, bem como a atividade antimicrobiana;
- Aplicar e avaliar o efeito dos filmes de quitosana sobre a conservação de filés de peito de frango embalados.



**CAPÍTULO II**  
**REVISÃO DA LITERATURA**



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 CARANGUEJO VERMELHO (*Chaceon notialis*)

O caranguejo vermelho pertence à família *Geryonidae*, que inclui caranguejos que habitam águas profundas e são alvo de pescarias de alto valor comercial em todo o mundo (PINHEIRO; BOOS, 2016; VAN DER ELST; EVERETT, 2015). A família *Geryonidae* é composta por três gêneros: *Chaceon*, *Geryon* e *Zariquieyon*. São reconhecidas 28 espécies na família *Geryonidae*, sendo 22 no gênero *Chaceon* (DAVIE; TURKAY, 2009; 2016). Esses caranguejos ocorrem em fundos lamosos e arenolamosos, onde a temperatura varia de 4 a 12 °C (PINHEIRO; BOOS, 2016). A Figura 1 apresenta o caranguejo vermelho (*C. notialis*).

**Figura 1** – Caranguejo vermelho



Os gerionídeos são caracterizados pela sua carapaça hexagonal, mais larga do que comprida, com margens anterolaterais convexas, cada uma das quais com 3 a 5 dentes, dependendo do gênero a que pertencem os indivíduos (DAVIE; TURKAY, 2009; 2016). O caranguejo vermelho se distribui do litoral da cidade de Rio Grande/RS (a 100 milhas náuticas, aproximadamente 180 km) à Argentina, sendo registrado em profundidades entre 120 e 1.000 m. No Brasil, a extensão de ocorrência da espécie totaliza cerca 30.000 km<sup>2</sup>, sendo parte do total característico, em áreas no Uruguai e Argentina (PINHEIRO; BOOS, 2016). A maturidade desse caranguejo é atingida, em média, com largura de carapaça de 8,9 cm para machos e 8,8 cm para as fêmeas. Quando adulto, pesa de 600 a 700 g e tem largura de 11 a 13 cm (SANT'ANA; PEZZUTO, 2009).

No Brasil, a pesca dirigida aos caranguejos de profundidade (*C. notialis*) é regulamentada pela Instrução Normativa n° 23, de 04 de dezembro de 2008, da extinta

Secretária Especial de Aquicultura e Pesca da Presidência da República. Nessa normativa foram estabelecidos os critérios e procedimentos, tais como: número máximo de embarcações (2 embarcações de nacionalidade brasileira), tipo e número máximo de armadilhas por embarcações (covos), limite máximo de captura (735 t de peso vivo) e profundidade mínima de operação (400 m) para captura dessa espécie de caranguejo (BRASIL, 2008).

A indústria pesqueira de Rio Grande que cedeu os resíduos do caranguejo vermelho, que tornaram-se subprodutos para este estudo, é a única no momento com permissão para a pesca desta espécie no Brasil, sendo um barco fatoria com aproximadamente 35.000 kg de produção mensal. A União Europeia é o principal mercado de destino, em especial a Espanha (BRASIL, 2008). A Figura 2 apresenta a embarcação fabril.

**Figura 2** – Barco fatoria da empresa e processamento do caranguejo



A: Embarcação. B: Captura nas armadilhas. C: Sala da manipulação. D: Lavagem dos caranguejos. E: Processamento. F: Separação dos subprodutos. G: Carapaças. H: Embalagem do produto final.

Segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization*), em 2012, foram processados 6,4 milhões de toneladas de crustáceos no mundo, correspondendo ao valor econômico de 22,4% do total de pescados (US\$ 30,9 bilhões), aumentando em 2014 para 6,9 milhões de toneladas (FAO, 2014; 2016). Em 2016, cerca de 7,9 milhões de toneladas de crustáceos foram processados, um aumento expressivo de 1 milhão de toneladas (FAO, 2018). Na industrialização de crustáceos é gerada grande quantidade de resíduos altamente perecíveis, já que grande parte do corpo dos animais, como carapaças e toda estrutura esquelética, patas e vísceras, não são destinadas ao consumo humano (ANTUNES-VALGAREGGI; FERREIRA; HENSE, 2017).

Yan e Chen (2015) relataram que apenas 30% do peso vivo dos crustáceos é considerado comestível, sendo o restante normalmente destinado a indústria de ração animal ou descartado de forma inadequada, sem nenhum reaproveitamento. Anualmente, são descartadas em oceanos de todo o mundo, milhares de toneladas de carapaças de crustáceos, sendo a degradação deste resíduo muito lenta, devido características como elevado conteúdo de nitrogênio e minerais, fazendo com que o descarte indevido contribua para o aumento da poluição ambiental (ANTUNES-VALGAREGGI; FERREIRA; HENSE, 2017; MEZZOMO, 2012).

### 3.2 SUBPRODUTOS INDUSTRIAIS DE CRUSTÁCEOS

Nas últimas décadas, a conscientização das atividades industriais associada à preservação ambiental passou a ser considerada prioridade. Além do fator ambiental, o aspecto econômico também ganhou destaque nas estratégias de aproveitamento de resíduos que se transformam em subprodutos industriais de alto valor agregado (FELIPE et al., 2017; LOPES et al., 2018). Atualmente, diversos processos são empregados com o intuito de agregar valor a diferentes subprodutos marinhos, visto que estes muitas vezes podem ser considerados matérias-primas potenciais para diferentes aplicações (CASTRO; GUERRERO-LEGARRRETA; BÓRQUEZ, 2019; DUN et al., 2019; HAMDI et al., 2018; LATORRES et al., 2018; ROCHA et al., 2018).

Os subprodutos industriais da comercialização de crustáceos são constituídos por compostos bioativos que podem ser recuperados e aplicados, principalmente, na indústria alimentícia e farmacêutica (ANTUNES-VALGAREGGI; FERREIRA; HENSE, 2017). Os exoesqueletos, em especial, são ricos em compostos de interesse, tais como: (a) minerais (de

20 a 50%); (b) proteína (de 20 a 40%); e (c) quitina (de 15 a 40%) (YAN; CHEN, 2015). A Tabela 1 apresenta a composição de diferentes subprodutos de marinhos.

**Tabela 1** – Composição química média apresentada por diferentes subprodutos marinhos

<b>Exoesqueleto</b>	<b>Minerais</b>	<b>Proteína</b>	<b>Quitina</b>	<b>Lipídios</b>
	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
Camarão	25,06	29,23	26,98	15,48
<i>(P. Longirostris)</i>				
Caranguejo	66,58	16,68	36,73	-
<i>(Paralithodes)</i>				
Mexilhão	23,25	9,99	23,25	-
Gladius de lula	2,57	36,52	31,20	0,32

Fonte: Adaptado de KNIDRI (2018)

Com base no exposto na Tabela 1 pode-se observar que as composições variam de espécie para espécie, além de apresentarem mudanças sazonais e variações entre diferentes partes do exoesqueleto (BOBELMANN, 2007). Muitas pesquisas (FRANCISCO; SIMORA; NUÑAL, 2015; GAMAL et al., 2016; GOMEZ-ESTACA et al., 2017; HAMDÍ et al., 2018; SAYARI et al., 2016; SEDAGHAT et al., 2017) estão sendo realizadas com o objetivo de identificar, desenvolver processos e destinar aplicações para esses compostos recuperados do processamento de crustáceos, visando agregar valor aos subprodutos usando tecnologias limpas, reduzindo a quantidade de rejeitos poluentes gerados. Em relação à quitina e seu derivado funcional, a quitosana, as carapaças de crustáceos são a fonte de obtenção mais abundante para o uso comercial, fato que deve-se ao seu elevado conteúdo e disponibilidade para recuperação a partir de fontes renováveis e de baixo custo (GORTARI; HOURS, 2013).

### 3.3 QUITINA

A quitina, denominação usual para o polímero poli ( $\beta$ -(1-4)-N-acetil-D-glicosamina), é o polissacarídeo mais abundante encontrado na natureza depois da celulose, sendo o termo quitina derivado do grego *Chiton*, que significa um revestimento protetor para invertebrados (ÖZOGUL et al., 2018). Em 2016, a produção natural de quitina em organismos vivos foi estimada em 100 bilhões de toneladas por ano (ELIEH-ALI-KOMI; HAMBLIN,

2016). Ela é comumente encontrada nos exoesqueletos de crustáceos, cutícula de insetos e na parede celular de fungos, conforme mostra a Tabela 2 (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016).

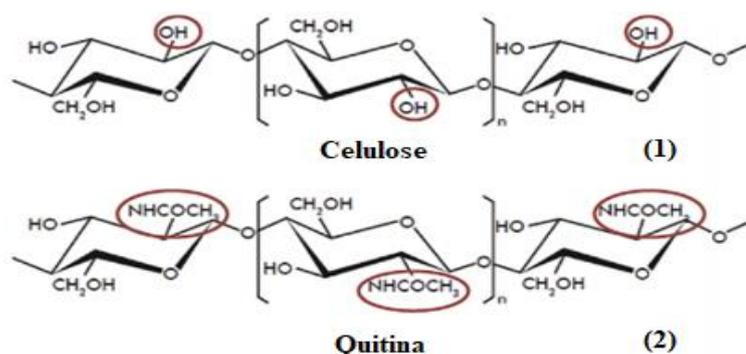
**Tabela 2** – Fontes naturais de quitina

Fonte	Quitina (%)
<b>Exoesqueletos de crustáceos</b>	
Caranguejo ( <i>Cancer</i> )	72,1
Siri azul ( <i>Callinectes</i> )	14,0
Camarão ( <i>Pandalus</i> )	40,0
<b>Insetos</b>	
Bicho-da-seda ( <i>Bombyx mori</i> )	44,2
Borboleta ( <i>Pieris</i> )	64,0
Barata ( <i>Blatella</i> )	18,4
<b>Fungos</b>	
<i>Mucor rouxii</i>	44,5
<i>Penicillium chrysogenum</i>	18,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,9

Fonte: Adaptado de HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN (2016)

A quitina e a celulose apresentam estruturas semelhantes, cuja diferença está na presença de um grupamento hidroxila (OH) no carbono-2 do anel glicosídico da celulose (RAMÍREZ et al., 2010). Na quitina, a hidroxila é substituída por um grupamento acetoamida (NHCOCH<sub>3</sub>), como pode ser observado na Figura 3.

**Figura 3** – Comparação entre a estrutura química da celulose (1) e da quitina (2)



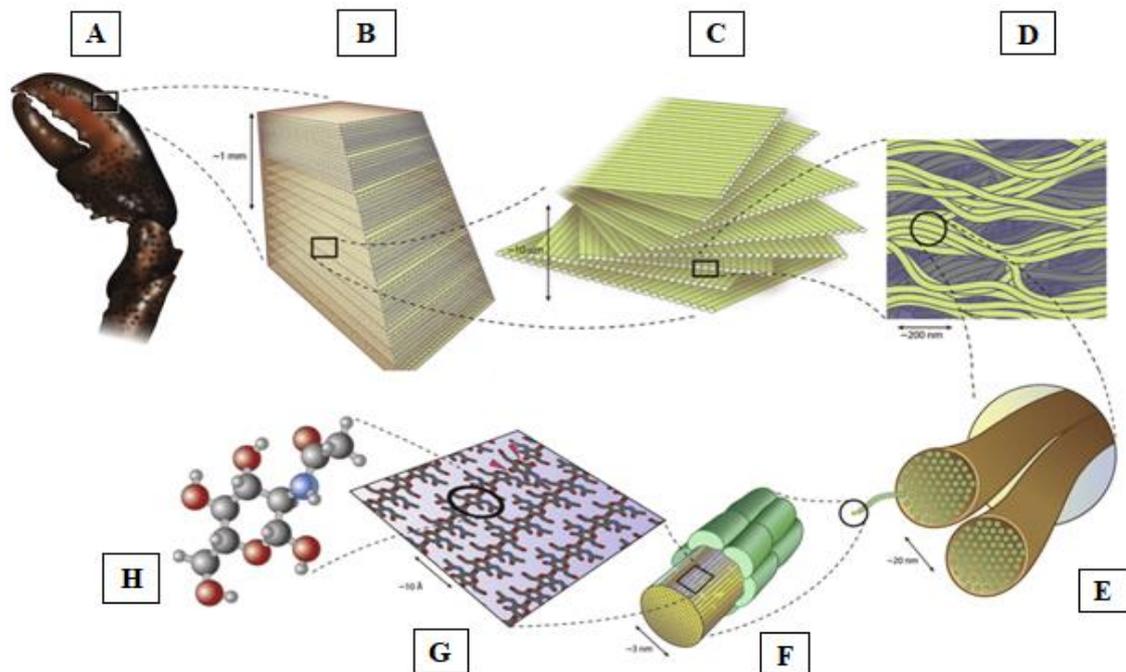
Fonte: Adaptada de RAMÍREZ et al. (2010)

A substituição da hidroxila no carbono C-2 pelo grupo acetamida confere a quitina alto grau de acetilação (GA), geralmente em torno de 90%. O grau de acetilação expressa à proporção de unidades N-acetil-glicosamina em relação às unidades N-glicosamina, que possui efeito determinante na solubilidade dos polímeros, diferenciando a quitina de seu derivado funcional, a quitosana (YOUNES; RINAUDO, 2015).

Esse polissacarídeo apresenta-se na forma de um pó amarelado, com estrutura cristalina ou amorfa, insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, devido às ligações inter e intramoleculares de hidrogênio que atuam na estrutura (ROY et al., 2017). Além disso, apresenta três estruturas polimórficas na natureza, denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ - quitina, na qual essas estruturas estão organizadas em folhas paralelas ou antiparalelas, presas por ligações de hidrogênio. Esses polimorfismos da quitina são diferenciados pela polaridade e empacotamento apresentado pelas cadeias adjacentes. A  $\alpha$ -quitina, a forma polimórfica mais encontrada, é uma estrutura rígida e resistente presente na cutícula de artrópodes (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016).

Diversos autores (ARANDAY-GARCÍA et al., 2017; DUN et al., 2019; GAMAL et al., 2016; HAMDI et al.; 2018; LOPES et al., 2018; YOUNES et al., 2012; ZHANG et al., 2012) têm abordado as barreiras enfrentadas nos processos de obtenção de quitina, uma vez que as propriedades do polímero e de seus derivados dependem do grau de polimerização, grau de acetilação e da massa molar, influenciados diretamente pelas condições de processo. Nos crustáceos, a quitina encontra-se associada aos demais constituintes do exoesqueleto, formando um complexo mineralizado com as proteínas, fenóis e lipídios, que se reticulam para formar estruturas macromoleculares altamente ordenadas, por isso são necessárias diferentes etapas de purificação e recuperação do polissacarídeo (VAN DYKEN; LOCKSLEY, 2018). A Figura 4 apresenta a organização estrutural da quitina associada aos demais constituintes. Pode-se observar que a quitina (A) é depositada em camadas planas repetidas, compostas de fibras mineralizadas de quitina-proteína (B-E). Dentro destas fibras, a extensa ligação de hidrogênio organiza cadeias de N-acetil-glicosamina poliméricas lineares em nanofibras (F-H), que podem ser clivadas internamente por endoquitinases e em extremidades livres não redutoras por exoquitinases ou por enzimas não específicas como proteases e/ou reagentes químicos (G) (VAN DYKEN; LOCKSLEY, 2018). Entretanto, quitina possui uma estrutura altamente ordenada que diminui consideravelmente a acessibilidade do substrato às enzimas e reagentes. A alta cristalinidade e a solubilidade limitada conferem resistência ao polissacarídeo ao ataque enzimático ou químico, sendo um fator limitante para a purificação (POSHINA et al., 2018).

**Figura 4** – Organização estrutural da quitina e demais constituintes



A: Quitina presente nos exoesqueletos de crustáceos. B-E: Detalhamento das fitas mineralizadas constituídas de quitina e proteína. F-H: Ligações de hidrogênio que associam os constituintes.

Fonte: Van Dyken e Locksley (2018)

A quitina é empregada como matéria-prima para a produção de glicosamina (GlcN), usada como suplemento nutricional para osteoartrite (AAM et al., 2010), e tem sido amplamente estudada na área de nanofibras, especialmente na utilização como suturas cirúrgicas, devido às suas propriedades de material forte e flexível, biodegradável e anti-inflamatório (DOBROVOL'SKAYA et al., 2015; WU et al., 2018). Contudo, devido à insolubilidade em água, geralmente a quitina é convertida no seu derivado funcional, a quitosana, que apresenta solubilidade em soluções ácido-aquosas (KNIDRI et al., 2018).

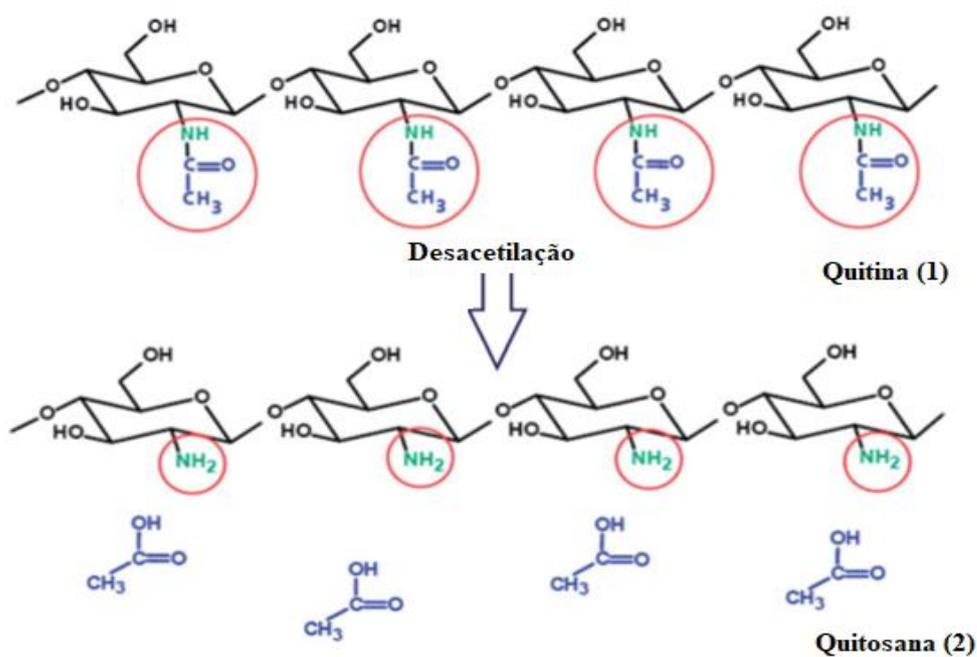
### 3.4 QUITOSANA

Descrita como derivado funcional da quitina, a quitosana é um polissacarídeo de cadeia linear, composto pela repetição de unidades de 2-amina-2-desoxi- $\beta$ -(1,4)-D-glicosamina e 2-acetamida-2-desoxi- $\beta$ -(1,4)-D-glicosamina, produzido através de uma reação de desacetilação (ÖZOGUL et al., 2018). Em função das condições empregadas nessa reação, as

características das quitosanas obtidas, tais como pureza, cristalinidade, são fortemente afetadas, influenciando diretamente nas aplicações deste polissacarídeo (AHMED; IKRAM, 2017).

Quimicamente, a quitosana é um polissacarídeo de massa molar na faixa de 105-250 kDa, encontrada comercialmente com grau de desacetilação (%GD) entre 50 e 95% (MOURA et al., 2015). A solubilidade apresentada pela quitosana é atribuída à presença dos grupos aminícos na sua estrutura, os quais são protonados em meio ácido, resultando em cargas positivas distribuídas ao longo de suas cadeias, que conferem hidrossolubilidade ao polissacarídeo e o torna disponível para reações químicas. Os grupos hidroxila nos carbonos C-6 (primário) e C-3 (secundário) também conferem reatividade ao polímero. A única diferença estrutural presente entre a quitosana e a quitina é a remoção dos grupamentos acetil (KNIDRI et al., 2018). A Figura 5 apresenta as estruturas de quitina e quitosana, em função da reação de desacetilação.

**Figura 5** – Comparação entre a estrutura química da quitina (1) e da quitosana (2)



Fonte: Adaptado de ARBIA et al. (2013)

Conforme mostra a Figura 5, a substituição do grupo acetamida na posição C-2 pelo grupo amina distingue quitina e quitosana. Logo, quando a fração de unidades de glicosamina é superior a 50%, o polímero é denominado de quitosana. A quitina, por outro lado, é o termo

empregado quando as unidades de N-acetil-glicosamina são superiores a 50% (ÖZOGUL et al., 2018).

A quitosana é um biopolímero carregado positivamente, bioadesivo, biocompatível, biodegradável, além disso atóxico e multifuncional (AHMED; IKRAM, 2017). Apresenta aplicações em diferentes áreas, tais como: agricultura (mecanismos defensivos e adubo para plantas), tratamento de água (floculante para clarificação, remoção de íons metálicos e redução de odores), indústria alimentícia (fibras dietéticas, redutor de colesterol e filmes bioativos) e médica (imunológico, antitumoral, hemostático e anticoagulante) (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016; KNIDRI et al., 2018). No Brasil, a quitosana é comercializada em forma pulverizada e encapsulada como fonte de fibra natural solúvel indicada como auxiliar na perda de peso e na redução do colesterol. A quitosana de grau analítico apresenta valor comercial elevado, pois 100 g custam R\$ 1.356,00 (GONÇALVES, 2011).

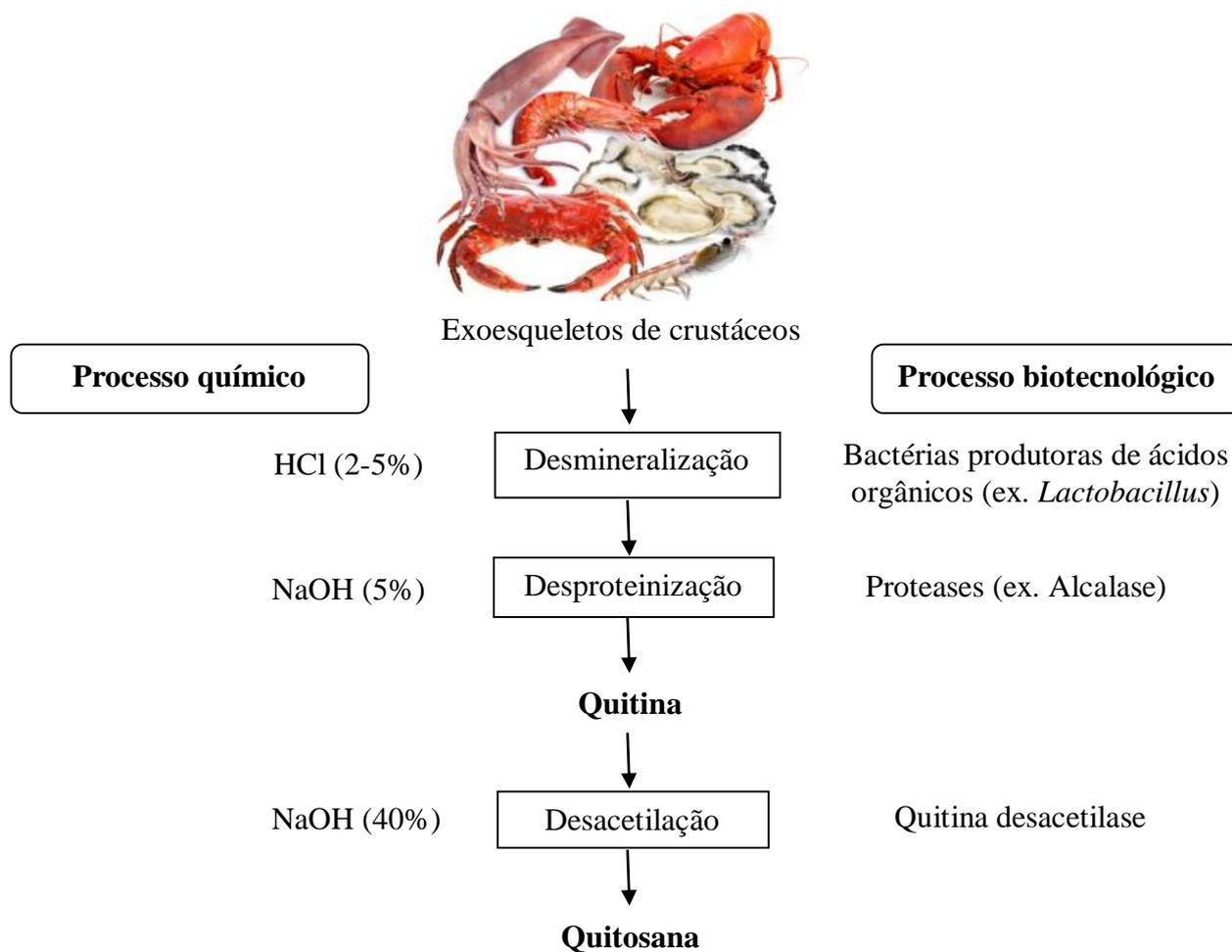
Atualmente, existe um grande interesse no uso de biopolímeros como matéria-prima para o desenvolvimento de filmes naturais, com aplicação como embalagem de alimentos. A quitosana tem grande potencial para uso como filmes ativos devido às suas propriedades biológicas como atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, dentre outras (ESCÁRCEGA-GALAZ et al., 2018). Os filmes à base de quitosana são finos, mas possuem propriedades como resistência à tração, flexibilidade, elasticidade e tenacidade, o que o torna adequado para uma ampla variedade de aplicações (ELSABEE; ABDU, 2013; SOGUT; SEYDIM, 2019).

### 3.5 PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA

O método convencionalmente empregado pelas indústrias no Brasil para a produção de quitina e quitosana baseia-se no uso de processos químicos aplicando ácidos inorgânicos para a etapa de desmineralização e álcalis para a desproteínização e desacetilação. Entretanto, os processos químicos apresentam aspectos negativos, por se tratar de uma fonte de poluição, reduzir a qualidade e causar a despolimerização dos polímeros (AHMED; IKRAM, 2017). Como uma alternativa ao processo químico, processos biotecnológicos têm sido estudados para vários crustáceos (BAUTISTA et al., 2001; HAMDÍ et al., 2018; JO et al., 2008; ZHANG et al., 2017). A produção biotecnológica utilizando bactérias produtoras de ácido láctico, proteases e quitina desacetilases podem reduzir a geração de resíduos altamente poluentes e a despolimerização, mantendo a qualidade dos polímeros em relação às suas propriedades e

funcionalidades (GORTARI; HOURS, 2013). A Figura 6 apresenta um esquema comparando a produção química e a biotecnológica.

**Figura 6** – Produção de quitina e quitosana por processos químicos e biotecnológicos



Fonte: Adaptado de KIM (2011)

A principal desvantagem do processo biotecnológico é o menor rendimento e maior tempo de processo, resultando em maior custo em comparação com o processo químico. No entanto, a produção biotecnológica mostra-se uma alternativa promissora devido ser uma tecnologia limpa e possibilitar a recuperação de subprodutos do processo, como os hidrolisados proteicos e as carotenoproteínas, que também são produtos de alto valor agregado podendo ser empregados em diferentes aplicações (DUN et al., 2019; LOPES et al., 2018; ZHANG et al., 2017).

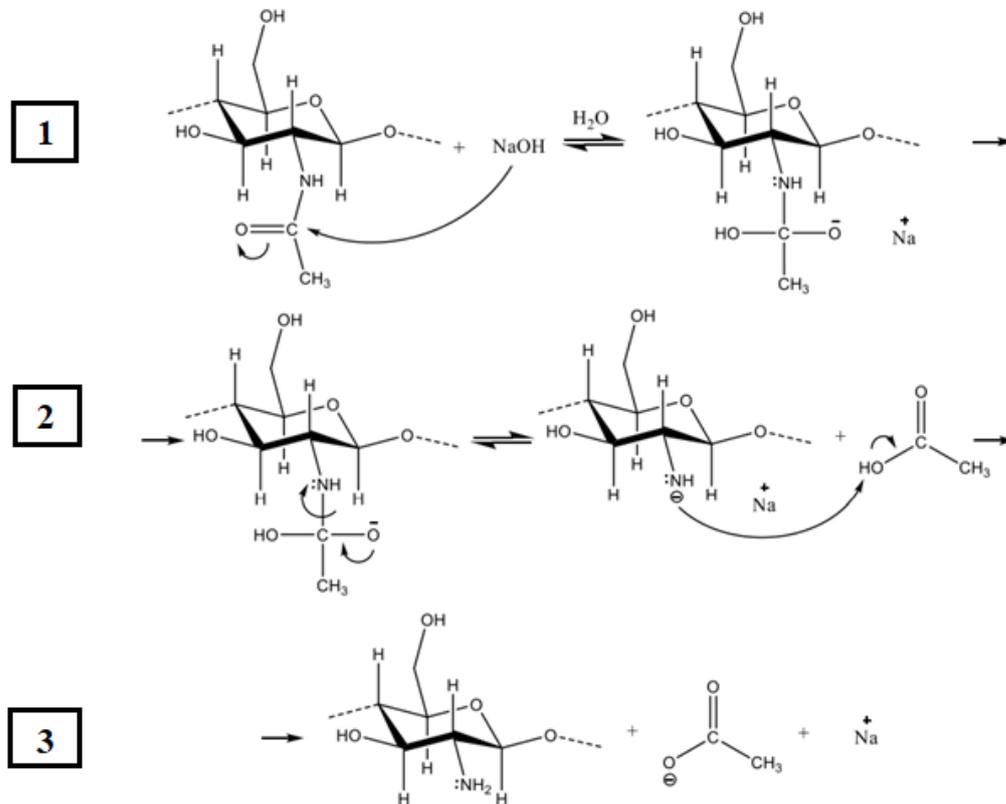
### 3.5.1 PROCESSO QUÍMICO

De forma geral, a obtenção de quitina por via química a partir de exoesqueletos de crustáceos pode ser esquematizada em quatro etapas de processamento: beneficiamento da matéria-prima, desmineralização, desproteínização e despigmentação (KNIDRI et al., 2018). Diversos trabalhos (ABDULKARIM et al., 2013; BENHABLES et al., 2012; MOHAMMED et al., 2013; MOURA et al., 2015) que têm como finalidade a recuperação de quitina e subsequente produção de quitosana, citam diferentes metodologias e rotas de produção pelas quais pode-se obter quitina com características e propriedades diversificadas, visto que o método de obtenção influencia diretamente a qualidade do polissacarídeo. O processo de desmineralização tem como objetivo a retirada do material inorgânico (minerais) da matéria-prima utilizando ácidos inorgânicos, sendo o ácido clorídrico (HCl 2-5% v/v) o mais utilizado (YOUNES; RINAUDO, 2015). Outra etapa de fundamental importância para a obtenção de quitina é a desproteínização, na qual consiste em remover a parte proteica presente na matéria-prima utilizando álcalis, em geral o hidróxido de sódio (NaOH 5% m/v). Essas reações ocorrem a elevadas temperaturas favorecendo a hidrólise da cadeia polimérica, ocasionando a despolimerização do polissacarídeo, comprometendo as funcionalidades e propriedades do mesmo (KNIDRI et al., 2018).

A produção de quitosana ocorre através da desacetilação dos grupos acetamida da estrutura da quitina, sob condições básicas, resultando nos grupos amina característicos da estrutura da quitosana. Como essa desacetilação é parcial, a cadeia polimérica da quitosana possui tanto monômeros acetilados quanto desacetilados (PRABU; NATARAJAN, 2012). Os fatores que influenciam a reação são: a concentração alcalina, a relação entre quantidade de solução alcalina e quantidade de quitina, o tempo e a temperatura. Estes fatores podem influenciar a massa molar e o grau de desacetilação do polímero (MOURA et al., 2015).

Apesar de não conseguir controlar a distribuição dos grupos acetil, o método termoquímico é o mais amplamente utilizado por apresentar elevada produtividade e menor tempo de processo frente a outros métodos. Na Figura 7 é mostrado o mecanismo reacional de produção da quitosana, através da reação da quitina com o hidróxido de sódio (NaOH 40% m/v). A finalidade da desacetilação alcalina é romper as ligações N-acetil do biopolímero, permitindo a formação das unidades de D-glicosamina que contém os grupos amínicos livres, principal fator das múltiplas propriedades biológicas e aplicações tecnológicas, visto que confere o caráter policatiónico ao polímero, resultando em uma elevada densidade de carga que facilita a reação com outras moléculas de carga negativa (YOUNES; RINAUDO, 2015).

**Figura 7** - Esquema do mecanismo de hidrólise alcalina da quitina para produção de quitosana



Fonte: Adaptado de SOLOMONS; FRYHLE (2009)

Com base na Figura 7 pode-se observar que a produção de quitosana, a partir da quitina precursora, trata-se de uma hidrólise da carbonila, na qual o ânion hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) da base ataca o carbono da ligação acetamida (1). Como a reação ocorre em meio aquoso, o intermediário de reação é destruído através do restabelecimento da dupla ligação  $\text{C}=\text{O}$ , promovendo a cisão da ligação entre carbono e nitrogênio e a formação de uma ligação covalente coordenada entre o átomo de nitrogênio terminal da cadeia e um átomo de hidrogênio da água (2). Com isso, forma-se ao final da reação a estrutura da quitosana, hidróxido de sódio e ácido acético (3) (SOLOMONS; FRYHLE, 2009).

### 3.5.2 PROCESSO BIOTECNOLÓGICO

Os resíduos remanescentes dos processos químicos são tóxicos e muito agressivos, elevando os custos de tratamento ou resultando em problemas ambientais quando descartados

de forma inadequada, além de que não permitem a reutilização das proteínas e minerais removidos, que poderiam ser utilizados nas indústrias de alimentos e de ração animal (AHMED; IKRAM, 2017). Em vista disso, diversas pesquisas têm buscado tecnologias mais limpas para produzir quitina e quitosana, produzindo produtos de elevada qualidade, devido o controle da cinética de produção com graus desejados de desacetilação e diminuindo os riscos de poluição ambiental (ANTUNES-VALCAREGGI; FERREIRA; HENSE, 2017; ARANDAY-GARCÍA et al., 2017; CASTRO; GUERRERO-LEGARRETA; BÓRQUEZ, 2019; DUN et al., 2019; HAMDI et al., 2018; VÁZQUEZ et al., 2017). Muitos micro-organismos, tais como bactérias e fungos, têm capacidade de produzir, sob condições ótimas, ácidos orgânicos, proteases e quitinas desacetilases que podem ser empregados no processo de produção dos polissacarídeos (AHMED; IKRAM, 2017).

A recuperação de quitina dos exoesqueletos de crustáceos baseia-se, principalmente, nas etapas de desmineralização e desproteínização. A desmineralização por processo biotecnológico é realizada através de fermentação microbiana utilizando bactérias produtoras de ácido láctico (BALs), tais como: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei*, *Pediococcus acidolactici*, *Lactobacillus acidophilus*, dentre outras. As BALs, de modo geral, possuem características morfológicas, metabólicas e fisiológicas semelhantes, são gram-positivas, não formadoras de esporos, possuem formato de cocos ou hastes e produzem ácido láctico através da fermentação de carboidratos (KHALID, 2011). Elas são microaerófilas, requerendo baixas concentrações de oxigênio e não tolerando o ar atmosférico, com crescimento mais acentuado em níveis de 1 a 15% (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1996). A temperatura ótima de crescimento pode variar de 20 a 45 °C e o pH de 5,5 a 6,5 (PANESAR et al., 2010). O ácido láctico produzido pelas bactérias reduz o pH e solubiliza o carbonato de cálcio e outros minerais das cascas exoesqueléticas dos subprodutos de crustáceos, propiciando a remoção destes constituintes. Para que a fermentação seja eficaz, diferentes condições são necessárias, tais como: composição do meio, inóculo, pH, temperatura, agitação, aeração e tempo de crescimento (ARBIA et al., 2013; CASTRO; GUERRERO-LEGARRETA; BÓRQUEZ, 2019; PACHECO et al., 2011; PRAMEELA et al., 2011; ZHANG et al., 2012).

Na etapa de desproteínização, o processo biotecnológico fundamenta-se na utilização de enzimas proteolíticas para clivar as ligações peptídicas das proteínas, desfazendo o complexo quitina-proteínas que constitui os exoesqueletos dos crustáceos, promovendo a separação das proteínas na forma de hidrolisados proteicos que ficam na fração solúvel resultante do processo (ANTUNES-VALCAREGGI; FERREIRA; HENSE, 2017; LOPES et

al., 2018; SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 2000; VALDEZ-PEÑA et al., 2010). As enzimas proteolíticas, também denominadas de proteases, constituem um grande grupo de enzimas que catalisam a quebra das ligações peptídicas presentes nas proteínas, liberando peptídeos de tamanho variável ou aminoácidos livres (RAWLINGS et al., 2014). A desproteínização dos subprodutos de crustáceos pode ser realizada por fermentação microbiana utilizando *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, dentre outros, ou utilizando enzimas comerciais como Alcalase, Delvolase e Savinase, dentre outras (ANTUNES-VALCAREGGI; FERREIRA; HENSE, 2017; GORTARI; HOURS, 2013; ZHANG et al., 2012). Os processos enzimáticos oferecem diversas vantagens quando comparado aos tratamentos químicos, incluindo reações em condições amenas e com grande especificidade ao substrato (BRYKSA; YADA, 2015). Segundo Kristinsson e Rasco (2000), as variáveis mais importantes em uma reação enzimática são: concentração e especificidade da enzima, temperatura e pH do meio reacional e a natureza do substrato.

Rao et al. (2000) estudaram o efeito de diferentes parâmetros de fermentação (ajuste inicial de pH com diferentes ácidos, concentração inicial de glicose e inoculação com diferentes quantidades de *L. plantarum*) individualmente e em combinação, sobre desproteínização (DP) e desmineralização (DM), e a inibição da deterioração durante fermentação de subprodutos de camarão. O tratamento combinado com *L. plantarum* e a redução do pH inicial do resíduo pela adição de ácido acético produziram menor DP (61%) e maior DM (90,76%) do que o tratamento com *L. plantarum* ou ácido individualmente. Segundos esses autores, a fermentação com bactérias lácticas resulta em eficiência de DM e qualidade do produto elevadas, sendo a adição de proteases comerciais uma alternativa para aumentar a DP.

Holanda e Netto (2006) estudaram a otimização do processo de hidrólise enzimática para DP para a recuperação dos subprodutos de camarão *Xiphopenaeus kroyeri*. No estudo foram utilizadas duas enzimas comerciais: Alcalase 2.4L e pancreatina suína. Ambas as enzimas estão sendo amplamente utilizadas no processamento de produtos marinhos, resultando em hidrolisados proteicos, com quantidades significativas de aminoácidos essenciais. Como resultados os autores verificaram que a hidrólise alcalina com NaOH 5% (m/v) foi mais eficiente (88,39%) em relação a hidrólise enzimática (59,50%) para desproteínização dos subprodutos. No entanto, ressaltam que o método químico não é indicado para a recuperação das proteínas remanescentes do processo, pois aminoácidos são perdidos, reduzindo o valor nutricional e tecnológico. A DP com Alcalase foi mais eficiente que a com pancreatina resultando em um teor de proteína residual na quitina de 9,31% e o teor de cinzas de 2,9%.

Duan et al. (2012) relataram a remoção de minerais utilizando *L. acidophilus* SW01, isolado de subprodutos de camarão. *L. acidophilus* SW1 foi comparado com outras BALs em termos de produção de ácido e DP durante a fermentação dos subprodutos. Os resultados mostraram que *L. acidophilus* produziu muito mais ácido que outras BALs e teve uma atividade proteolítica muito maior. Segundo os autores, com mais proteínas removidas, mais minerais são expostos a um ambiente ácido, o que levou a maior eficiência na DM. Em fermentações em escala laboratorial, o teor de minerais e proteínas foi de 0,5 e 5,4% às 168 h de fermentação. Este teor de minerais ficou próximo ao padrão da China para a quitina (o teor de cinzas e proteínas inferior a 1% para produtos de alta qualidade).

Sedaght et al. (2017) estudaram a bioconversão dos subprodutos de camarão *Penaeus merguensis* para a recuperação de quitina e posterior produção de quitosana. A recuperação de quitina dos subprodutos foi realizada através da fermentação com *Pseudomonas aeruginosa*. A fim de encontrar as condições ideais, os autores avaliaram a incubação a 30 °C e 100 rpm em diferentes concentrações de glicose (0%, 10%, 15% e 20%) e inoculação (10%, 15% e 20%) durante 4 e 6 dias. Os resultados encontrados mostraram uma relação direta entre os diferentes parâmetros estudados e as taxas de desproteinização e desmineralização, de modo que as condições ótimas foram 20% de glicose, 20% de inoculação e 6 dias de fermentação. Essas condições levaram a 82% de DM e 92% de DP, com rendimento de quitina de 47%.

Lopes et al. (2018) avaliaram a sustentabilidade do produto químico e do processo enzimático para obter quitina a partir da biomassa de crustáceos em escala piloto. Segundo esses autores, desenvolver uma maneira sustentável de refinar os subprodutos de crustáceos poderia estimular a bioeconomia em bilhões de dólares. Em vista disso, os resultados do estudo foram avaliados e integrados por um método hierárquico, a fim de fornecer uma comparação direta e abrangente entre ambos os processos. Como principais resultados, esses autores verificaram que o processo enzimático, utilizando enzima Alcalase, pode ser uma alternativa adequada para a recuperação de quitina e outros compostos de interesse, pois apresenta diversas vantagens, como a preservação da estrutura polissacarídica, além da menor geração de resíduos. Entretanto, o método químico continua sendo o processo convencionalmente utilizado em larga escala devido ao menor tempo de processo e maiores rendimentos.

Dun et al. (2019) avaliaram a recuperação de quitina dos subprodutos de lagostim através da fermentação simultânea a hidrólise enzimática utilizando *Bacillus coagulans* LA204 e proteinase K. O processo biotecnológico simultâneo foi conduzido a 50 °C com 5% (m/v) das cascas trituradas de lagostim, 5% (m/v) de glicose, 1000 U de proteinase K por g de subproduto e 10% de inoculação para *B. coagulans* LA204 em bioreator estéril. Após 48 h de processo, a

eficiência de DP e de DM alcançou 93% e 91%, respectivamente, sugerindo uma nova estratégia satisfatória para a obtenção de quitina.

A produção biotecnológica de quitina e seus derivados desperta o interesse de pesquisadores em todo mundo. Entretanto, devido aos custos mais elevados de produção, baixo rendimento do produto e maior tempo de processo, o método ainda tem uso limitado em larga escala e novos estudos buscam otimizar as condições do processo. Porém, para diminuir o emprego de reagentes químicos tóxicos e reduzir a geração de rejeitos poluentes, sugere-se o emprego do processo químico combinado ao processo biotecnológico (AHMED; IKRAM, 2017; DUN et al., 2019).

### 3.6 PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DA QUITINA E QUITOSANA

Sabe-se que a quitina e a quitosana possuem diversas atividades biológicas, incluindo efeito antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório e muitas outras propriedades que podem ser utilizadas pelas indústrias de alimentos, farmacêuticas, médicas, agrícolas, dentre outras. Em especial, na indústria alimentícia, a quitina e a quitosana podem auxiliar na segurança de alimentos, mantendo a qualidade e prolongamento a vida útil através do efeito antimicrobiano (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016).

A quitosana pode ser utilizada na indústria de alimentos como conservante de alimentos, visto que apresenta atividade antimicrobiana, o que permite proteger os alimentos da deterioração microbiana (SINHA; CHAND; TRIPATHI, 2014; GOY et al., 2016; MOUSAVI KHANEGHAH; HASHEMI; LIMBO, 2018). A atividade antimicrobiana da quitosana está associada às suas cargas positivas, que interagem com cargas negativas das paredes celulares microbianas, causando perdas no conteúdo intracelular dos micro-organismos que levam à perda da viabilidade celular (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010). As coberturas e os filmes elaborados à base de quitosana para o revestimento de vegetais, frutas, grãos e pescados permitem o armazenamento a longo prazo dos produtos alimentícios, retardando a multiplicação microbiana, pois a quitosana age como uma barreira antimicrobiana protetora para manutenção da qualidade sensorial e nutricional dos alimentos (SINHA; CHAND; TRIPATHI, 2014). Os filmes comestíveis à base de quitosana são biodegradáveis e podem ser consumidos juntamente com o produto na embalagem. Além disso, formam filmes flexíveis com boas propriedades mecânicas, protegendo a aparência e a qualidade do alimento em seu interior (ELSABEE; ABDU, 2013).

Além da utilização como embalagem ativa de alimentos, estudos têm relatado a aplicação de quitosana combinada a fibras naturais, como algodão e lã, e fibras sintéticas, como poliésteres, como um antimicrobiano em têxteis, devido à sua solubilidade em água, bioadesividade, densidade de carga positiva, biocompatibilidade e atoxicidade (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009; LIU et al., 2015; YOUNES; RINAUDO, 2015). O crescimento de micro-organismos, como bactérias e fungos, nos têxteis pode diminuir a resistência mecânica do tecido e causar odores desagradáveis, não apenas no próprio tecido, mas no usuário (LIU et al., 2015).

Curativos à base de quitina e quitosana foram estudados para proteger queimaduras e feridas das infecções bacterianas, visto que estes polissacarídeos atuam como matrizes artificiais da pele, capazes de promover uma rápida regeneração dérmica (KHOR; LIM, 2003). Quando aplicados em tratamentos de queimaduras, são degradados por enzimas endógenas, sendo uma grande vantagem, pois a remoção do curativo pode causar danos e trauma às lesões (DUTTA et al., 2004). Sendo assim, esses polímeros são descritos como curativos ideais, pois umedecem a interface da ferida, são permeáveis ao oxigênio e permitem a troca gasosa, atuando como uma barreira aos micro-organismos devido à sua atividade antimicrobiana, sendo capaz de remover o excesso de secreções (AZUMA et al., 2015).

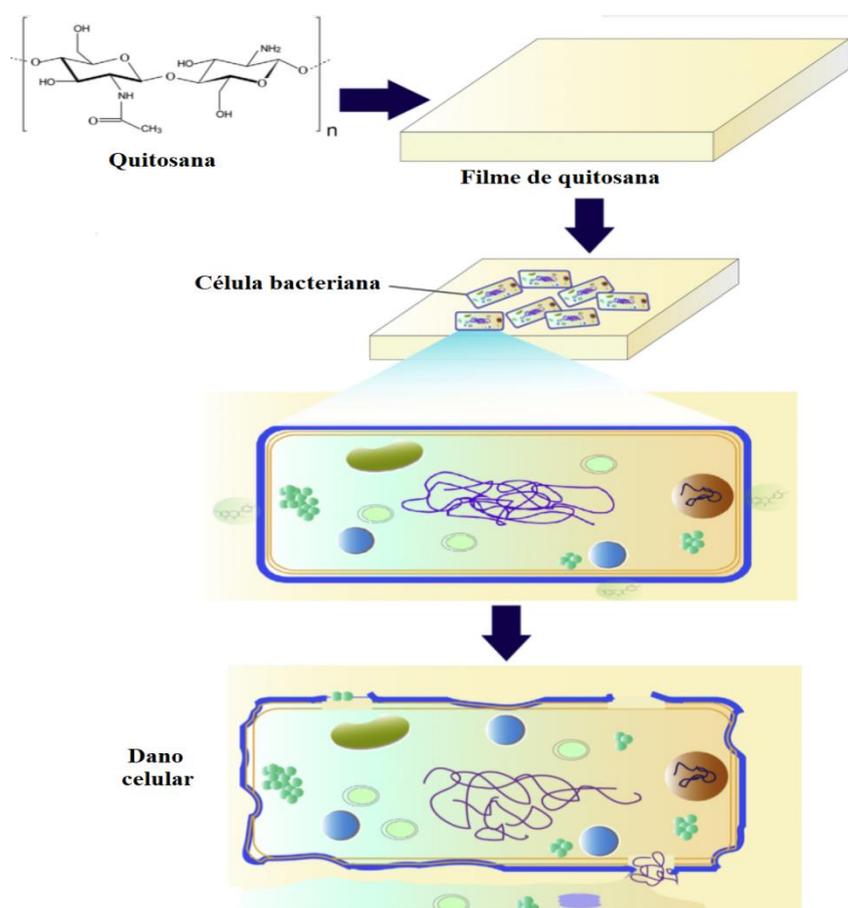
### **3.6.1 Atividade antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana da quitosana é o resultado de uma série de reações entre as moléculas de quitosana e as paredes celulares dos micro-organismos, sendo a eficiência das reações influenciada pela morfologia da parede. Embora possua um amplo espectro de atividade antimicrobiana, a quitosana apresenta uma eficiência inibitória diferente contra fungos, bactérias gram-positivas e gram-negativas. Diferentes trabalhos (GOY et al.; 2016; KONG et al., 2010; SILALAIH et al., 2016; ZHONG et al., 2008) relatam uma diminuição da atividade frente aos micro-organismos gram-negativos em virtude da parede celular que os mesmos possuem, com uma estrutura adicional, chamada de membrana externa, que contém proteínas e lipopolissacarídeos, dificultando a difusão dos compostos antimicrobianos para o interior da célula.

Várias propriedades da quitosana são reconhecidas por influenciar sua atividade antimicrobiana, tais: grau de desacetilação, massa molar, pH, composição do meio e micro-organismo alvo (KONG et al., 2010). Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar o efeito antimicrobiano deste polissacarídeo. Entretanto, o mais difundido atribui a atividade

antimicrobiana à capacidade dos grupos amina, carregados positivamente, interagirem com a superfície de carga negativa da parede microbiana ou da membrana plasmática, como apresenta a Figura 8. Essa interação causa uma modificação na permeabilidade da célula, levando a um dano osmótico com o extravasamento de íons e proteínas do citoplasma para o espaço extracelular (SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016).

**Figura 11** – Mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana



Fonte: Adaptado de SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI (2016)

Portanto, a densidade de carga positiva da quitosana é um fator de extrema importância na sua atividade antimicrobiana, ou seja, quanto maior a densidade de carga positiva, mais fortes as interações eletrostáticas com a superfície da célula microbiana (KONG et al., 2010). Os fatores intrínsecos relacionados à estrutura química da quitosana afetam a densidade de carga positiva tais como o grau de desacetilação e distribuição dos grupos amina ao longo da cadeia polimérica (MOUSAVI KHANEGHAH; HASHEMI; LIMBO, 2018). Segundo Kong et al. (2008), microesferas de quitosana com grau de desacetilação 97,5%,

levaram a uma densidade de carga positiva mais alta, o que conferiu maior atividade antimicrobiana em comparação a quitosanas com graus de desacetilação moderados (83,7%) frente ao micro-organismo *Staphylococcus aureus* em pH 5,5.

Younes et al. (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana de 15 quitosanas comerciais diferentes, com características bem definidas em termos de grau de desacetilação e massa molar. O efeito antimicrobiano foi avaliado pelo método disco-difusão em ágar, pela contagem de células viáveis e pela concentração inibitória mínima, realizada em diferentes valores de pH. Os autores verificaram que bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella enteritidis*) apresentaram maior susceptibilidade a quitosana em comparação com bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* e *Micrococcus luteus*). O aumento da atividade antimicrobiana é relacionado à diminuição do grau de acetilação, massa molar e pH, visto que amostras de quitosana com grau de acetilação 12% e massa molar de 75 kDa foram suficientes para provocar a inativação completa de *E. coli* e de *P. aeruginosa*, enquanto para *S. aureus* e *B. cereus* tiveram a atividade pronunciada com quitosanas de maior massa molar (> 110 kDa). Além disso, o mesmo estudo evidenciou que a atividade antimicrobiana da quitosana foi maior em pH menor (pH 4,4), onde o grau de protonação é maior.

A indústria alimentícia enfrenta constantemente o problema de contaminação microbiana. A contaminação microbiana pode acarretar doenças transmitidas por alimentos (DTAs) e também pode acelerar a deterioração de alimentos com enormes perdas econômicas. Em vista disso, embalagens com potencial antimicrobiano representam uma alternativa para prevenir e retardar a invasão e multiplicação de micro-organismos. Diversas pesquisas (AVILA-SOSA et al., 2016; AZADBAKHT et al., 2018; PANARIELLO et al., 2019; RIAZ et al., 2018; SIRIPATRAWAN, KAEWKLIN, 2018; SOGUT; SEYDIM, 2018; 2019) têm sido desenvolvidas utilizando a quitosana para a elaboração de embalagens antimicrobianas visando a segurança dos alimentos e o prolongamento da vida útil.

Azadbakht et al. (2018) estudaram a aplicação de filmes à base de quitosana incorporados com óleo essencial de *Eucalyptus globulus* como embalagem ativa para salsichas fatiadas. A atividade antimicrobiana foi avaliada frente a *S. enteritidis* e *E. coli* como bactérias gram-negativas e *B. cereus* e *S. aureus* como bactérias gram-positivas. Esses autores verificaram um excelente efeito antimicrobiano, com os filmes de quitosana incorporados com o óleo de *E. globulus* reduzindo a multiplicação microbiana para *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus* e *S. enteritidis* apresentando contagem final de 4,22, 3,98, 4,55 e 4,71 Log UFC/g, respectivamente.

### 3.7 FILMES POLIMÉRICOS E EMBALAGENS ATIVAS

A embalagem é um componente essencial na indústria de alimentos, sendo imprescindível para que o alimento mantenha suas características organolépticas, possua qualidade e promova segurança. Portanto, é necessário avaliar qual embalagem é mais adequada para cada tipo de matéria-prima (THARANATHAN, 2003).

O Brasil é um grande produtor de alimentos e, conseqüentemente, usa grande quantidade de embalagens. Os materiais plásticos convencionais satisfazem as necessidades de custo, praticidade, proteção física, química e ótica, porém levam mais de cem anos para se degradarem no ambiente. Estes influenciam diretamente na poluição ambiental uma vez que são responsáveis por grande parte dos resíduos acumulados na natureza (RHIM; PARK; HA, 2013).

Os polímeros sintéticos são obtidos por reações de polimerização, onde monômeros, geralmente derivados do petróleo, são transformados em macromoléculas. O tamanho das cadeias formadas principalmente por átomos de carbono, ou seja, a massa molar, é a principal característica que confere a estes materiais várias peculiaridades que os diferenciam dos demais. Esses polímeros geralmente apresentam baixa densidade, pequena resistência ao calor, baixas condutividades elétrica e térmica, entre outros (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012). Contudo, são crescentes as preocupações com relação ao uso destes polímeros e o desenvolvimento de embalagens a partir de matérias-primas renováveis tem recebido maior atenção nos últimos anos (RHIM; PARK; HA, 2013).

Os polímeros naturais têm sido estudados em relação às suas propriedades de formação de filmes destinados a embalagem de alimentos (HASSANZADEH et al., 2017; ROCHA et al., 2014; ROCHA et al., 2018; ROMANI; PRENTICE; MARTINS, 2018; ROMANI et al., 2019; SOGUT; SEYDIM, 2019). Segundo Falguera et al. (2011), os filmes são utilizados para envolver os produtos, mas primeiramente são formados separadamente como lâminas finas e após são utilizados como revestimento. Em vista do impacto positivo sobre o ambiente, macromoléculas naturais tais como os polissacarídeos (HIGUERAS et al., 2014; LEKJING, 2016; ROCHA et al., 2018; SOGUT; SEYDIM, 2018; 2019), proteínas (EL HALAL et al., 2015; ROCHA et al., 2014) e lipídios (VIDAWATIA et al., 2011) vêm sendo extensivamente estudados para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis. Além das macromoléculas (agente formador do filme), a elaboração dos filmes envolve a utilização de solventes (água, etanol ou ácidos orgânicos), de plastificantes (glicerol, sorbitol, entre outros) e um agente ajustador de pH no caso de filmes à base de proteínas (hidróxido de sódio, ácido

clorídrico, ácido acético entre outros), obtendo-se uma dispersão filmogênica (FALGUERA et al., 2011). Os filmes são formados por forças coesivas entre as moléculas de polímeros, ou reticulação intramolecular das cadeias do polímero para formar uma matriz parcialmente rígida, que permite imobilizar parte do solvente. Uma das técnicas utilizadas para esta formação é denominada “*casting*”, um procedimento bastante difundido na formação de filmes. Este processo consiste na solubilização das macromoléculas em solventes, seguida da aplicação dessa solução filmogênica sobre um suporte e posterior evaporação do solvente (KROCHTA; BALDWIN; NISPEROS-CARRIEDO, 1994).

O uso de filmes à base de polímeros naturais depende de vários fatores como o custo, disponibilidade, atributos funcionais, propriedades mecânicas (resistência e flexibilidade), qualidades ópticas (brilho e opacidade), propriedades de barreira (permeabilidade ao vapor de água, O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>), resistência à água (solubilidade) e aceitação sensorial. Estas características resultam de diversos parâmetros, tais como: características físico-químicas, concentração da macromolécula e dos demais constituintes (solvente, plastificante, agente antimicrobiano, antioxidante, entre outros), pH, condições de secagem e condições ambientais (temperatura e umidade) (FALGUERA et al., 2011; VIEIRA et al., 2011).

Entre os diferentes polímeros usados na preparação de filmes, os polissacarídeos se destacam, devido à sua relativa abundância e baixa toxicidade (FALGUERA et al., 2011; MILKOVA; RADEVA, 2015). Os polissacarídeos se apresentam na forma linear ou ramificada, sendo compostos pela repetição do mesmo ou mais monossacarídeos. Estes podem apresentar carga neutra (ágar e metilcelulose), carga negativa (alginato de sódio e pectina) ou carga positiva (quitosana), dependendo do grupo químico ligado aos monossacarídeos. Em geral, eles formam filmes com boas propriedades mecânicas e de barreira ao O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, mas assim como as proteínas não oferecem barreira à umidade devido à sua característica hidrofílica (MILKOVA; RADEVA, 2015).

Tradicionalmente, os materiais de embalagens têm sido selecionados no sentido de ter a mínima interação com o alimento que acondicionam constituindo, assim, barreiras inertes, com a função de proteger o produto embalado. Entretanto, na última década, estudos tem desenvolvido sistemas de embalagens com o objetivo de interagir com o alimento, pelo uso de matrizes biodegradáveis e aditivos naturais, planejados para corrigir deficiências das embalagens passivas, e sendo chamadas de embalagens biodegradáveis ativas (IAHNKE et al., 2016). Essas embalagens podem ser definidas como embalagens que modificam as condições do ambiente que o alimento se encontra com o objetivo de prolongar a sua vida útil, sem alterar

as características sensoriais e de segurança, e manter a qualidade do alimento (FERREIRA et al., 2014).

A embalagem ativa deve obedecer os seguintes requisitos: (a) ser segura em termos de saúde pública; (b) absorver/emitir o gás ou vapor de interesse em velocidade adequada; (c) oferecer elevada capacidade de absorção do gás ou vapor de interesse; (d) não causar reações paralelas adversas; (e) não causar modificações organolépticas no produto; (f) manter-se estável durante a estocagem; (g) ser compacta; e (h) apresentar custo compatível com a aplicação (SARANTÓPOULOS et al., 1996)

### **3.7.1 Aplicação de filmes de quitosana em alimentos**

A bioatividade da quitosana pode ser utilizada na conservação de produtos alimentícios através da incorporação como ingrediente para a produção de alimentos funcionais, que poderia prevenir doenças relacionadas à idade e à dieta, ou como embalagem ativa de alimentos (ARANKU et al., 2018; KERCH, 2015; NOORI; ZEYNALI; ALMASI, 2018; TAKMA; KOREL, 2019).

Dentre os polissacarídeos, a quitosana tem despertado interesse como matriz polimérica para a elaboração de filmes por ser biodegradável, obtida de fontes abundantes e baratas, além de destacar-se por suas propriedades tecnológicas e biológicas adequadas, tais como biocompatibilidade, propriedades antimicrobianas e antioxidantes, permeabilidade seletiva de gases ( $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$ ), resistência e flexibilidade, aparência desejável e atoxicidade (ELSABEE; ABDU, 2013; LISKOVÁ et al., 2014).

Cada alimento tem seu mecanismo de degradação característico, que muda de acordo com a sua composição e tipo de processamento a que foi submetido. Com o objetivo de diminuir a degradação desses produtos, vários mecanismos podem ser empregados, sendo o emprego das embalagens ativas uma das principais alternativas. Muitos processos podem acontecer no interior das embalagens que vão depender das propriedades do alimento e da forma como ele interage com o ambiente externo (BRAGA; PERES, 2010).

Os filmes de quitosana vêm sendo estudados quanto ao emprego como embalagem ativa, em virtude das suas atividades antimicrobiana e antioxidante, em diversos produtos alimentícios como cárneos, massas frescas e pães, queijos, óleos vegetais, frutas e hortaliças frescas, dentre outros (ELSABEE; ADBOU, 2013). Além disso, esses filmes são fortes e difíceis de rasgar devido suas propriedades mecânicas que podem ser comparadas aos polímeros de força média. Entretanto, o uso comercial desses filmes como embalagem tem sido limitado

em função dos problemas relacionados à fraca barreira à umidade, quando comparados aos polímeros sintéticos (SOUZA; SILVA; DRUZIAN, 2012).

### 3.7.1.1 Carne de frango

A Portaria nº 210 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define carne de frango como “a parte muscular comestível das aves abatidas, declaradas aptas à alimentação humana por inspeção veterinária oficial antes e depois do abate” (BRASIL, 1998). Nas últimas décadas, a avicultura brasileira tem apresentado altos índices de crescimento (MEZARROBA, 2014). Segundo dados da União Brasileira de Avicultura (UBABEF, 2018), a produção de carne de frango chegou a 13,05 milhões de toneladas em 2017. O Brasil manteve a posição de maior exportador mundial e de segundo maior produtor deste tipo de carne, atrás apenas dos Estados Unidos. Do volume total de frangos produzido pelo país, 66,9% foi destinado ao consumo interno, e 33,1% para exportações. Com isto, no ano de 2017, o consumo per capita de carne de frango no Brasil atingiu 42,07 kg por pessoa. Dos produtos exportados, 63% foram na forma de cortes, tais como: filé de peito de frango sem pele, coxa, sobrecoxa, coxinha da asa, asa inteira, dentre outros (UBABEF, 2018).

O consumo nacional de carne de frango, comparativamente com outros tipos de carne, vem apresentando crescimento em virtude desta carne ser considerada mais saudável pelos consumidores do que as carnes bovina e suína, em função do menor teor de gordura (MEZARROBA, 2014). A carne *in natura* é comercializada como carcaças, cortes (parte ou fração da carcaça) ou recortes (parte ou fração do corte), necessariamente resfriados, ou então, congelados (BRASIL, 1998), pois se trata de um alimento muito perecível, devido às suas características intrínsecas como composição química, elevada atividade de água ( $A_w$ ) e pH próximo da neutralidade, em que é necessária a aplicação de métodos de conservação e armazenamento para retardar ou evitar alterações que comprometem sua qualidade (TAKMA; KOREL, 2019). Os filés de peito de frango estão entre os produtos mais consumidos no Brasil e de acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) (UNICAMP, 2011) apresentam como composição química (sem pele e cru), em média, 74,8% de umidade, 21,5% de proteína e 3,0% de lipídios.

Em alimentos cárneos, a contaminação microbiológica ocorre em maior intensidade, requerendo desta forma um efetivo controle do crescimento microbiano. Com isso, estudos estão sendo direcionados no desenvolvimento de filmes e coberturas antimicrobianas que atuam inibindo a multiplicação microbiana, principalmente na superfície destes alimentos

que estão diretamente em contato com a embalagem (HASSANZADEH et al., 2017). Na Tabela 3 são apresentados alguns trabalhos que envolvem o estudo de embalagens ativas para conservação de filés de frango.

**Tabela 3** – Filmes naturais aplicados como embalagem de filés de frango

<b>Referência</b>	<b>Embalagem ativa</b>
Sogut e Seydim (2018)	Filmes à base de quitosana e extrato de semente de uva embalados a vácuo
Giteru et al. (2017)	Filmes à base de kafirin incorporando citral e quercetina
Moreno et al. (2018)	Filmes bicamadas de amido e gelatina
Sogut e Seydim (2019)	Filmes bicamadas à base de quitosana e policaprolactona incorporados com extratos da semente de uva e nanocelulose
Stratakos et al. (2015)	Filmes de poliamida e polietileno incorporados com óleo essencial de coentro associado ao processamento de alta pressão
Fernández-Pan, Carrión-Granda e Maté (2014)	Eficiência antimicrobiana de coberturas comestíveis na preservação de filés de peito de frango
Takma e Korel (2019)	Filmes de quitosana e alginato incorporados com óleo essencial de cominho

A multiplicação e tipos de micro-organismos que se desenvolvem na carne dependerão das condições de abate, condições e estresse do animal, evisceração correta, além da temperatura durante o transporte e armazenamento (ALCANTARA et al., 2012). A carne de frango é muito suscetível à deterioração microbiana resultando assim em um produto de vida útil muito curta. Além disso, o conteúdo lipídico da carne leva a reações de oxidação que afetam negativamente a qualidade da carne na presença de oxigênio (HIGUERAS et al., 2014; VAITHIYANATHAN et al., 2011). Em vista disso, embalagens a vácuo vêm sendo utilizadas para prolongar a vida útil de carnes e produtos cárneos, através da remoção do ar, inibindo o crescimento de micro-organismos aeróbios, oxidação, alteração na cor e mantendo as características sensoriais do produto, principalmente o frescor (DEGIRMENCIOGLU et al.,

2012). Além disso, o emprego de filmes ativos em carnes tem despertado interesse, visto sua ação antimicrobiana e antioxidante, sendo uma alternativa para extensão da vida útil e manutenção da qualidade do produto, reduzindo os riscos a saúde dos consumidores, bem como as perdas econômicas para os produtores (DOMÍNGUEZ et al., 2018; SOGUT; SEYDIM, 2018; 2019; MULLA et al., 2017).

Sogut e Seydim (2019) avaliaram o efeito de filmes à base de quitosana e policaprolactona (PCL) contendo nanocelulose e extrato de semente de uva na conservação de filés de frango embalados, analisando os filés quanto às suas características físico-químicas (mudança de pH, cor e estabilidade lipídica) e características microbiológicas (mesófilos aeróbios totais e coliformes totais durante 15 dias sob refrigeração). Esses autores verificaram que os filmes mantiveram o pH dos filés estável durante o armazenamento. Amostras embaladas com os filmes ativos apresentaram maior estabilidade lipídica, com valores das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico menores que o controle ( $p < 0,05$ ), e levaram a uma redução significativa do grupo de micro-organismos avaliado ( $p < 0,05$ ) durante todo o armazenamento, quando comparados com as amostras controle. Portanto, os resultados indicaram que filmes de quitosana com policaprolactona incorporado de nanocelulose e extrato de semente de uva podem ser um material de embalagem promissor para aplicação em alimentos devido suas características de embalagem ativa.



## **CAPÍTULO III**

### **DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO**



## APRESENTAÇÃO

As atividades da dissertação foram desenvolvidas junto ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) e demais laboratórios pertencentes à Escola de Química e Alimentos (EQA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). O presente estudo foi realizado em duas etapas. Na primeira, obteve-se e caracterizou-se quitina e quitosana. Na segunda, elaborou-se filmes a partir da quitosana obtida, aplicando em filés de peito de frango para avaliar o efeito na conservação destes. Cada uma destas etapas correspondeu a um artigo científico, conforme descrito a seguir:

**ARTIGO I:** Caracterização de quitina e quitosana obtidas por processo misto a partir dos exoesqueletos do caranguejo vermelho (*Chaceon notialis*);

**ARTIGO II:** Efeito de filmes bioativos à base de quitosana obtida de subprodutos de crustáceos no prolongamento da vida útil de filés de frango.



ARTIGO I

CARACTERIZAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA OBTIDAS POR PROCESSO MISTO  
A PARTIR DOS EXOESQUELETOS DO CARANGUEJO VERMELHO (*Chaceon notialis*)



## RESUMO

Os crustáceos estão entre os produtos marinhos mais rentáveis economicamente. Entretanto, no seu processamento, são geradas elevadas quantidades de resíduos, que muitas vezes são descartados de forma inadequada ou são subvalorizados. Estes resíduos podem ser reaproveitados como subprodutos industriais representando uma fonte importante de moléculas bioativas que podem ser recuperadas e aplicadas na indústria de alimentos. O presente trabalho teve como objetivo estudar a obtenção de quitina e seu derivado funcional quitosana, a partir dos exoesqueletos do caranguejo vermelho (*Chaceon notialis*), associando processo biotecnológico ao químico, para assim reduzir o uso de solventes e diminuir a quantidade de rejeitos tóxicos e poluentes gerados. Para tanto, as carapaças trituradas foram desproteinizadas por hidrólise enzimática com a enzima Alcalase (2% enzima/substrato), seguida da desmineralização por processo fermentativo com *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 durante 96 h a 32 °C. Em seguida, a quitina obtida foi submetida à desacetilação química, para a produção de quitosana, utilizando hidróxido de sódio (40% m/v). Os polissacarídeos foram caracterizados quanto à composição proximal, cor, solubilidade, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia no infravermelho, calorimetria diferencial de varredura e análise termogravimétrica. Na quitosana, foram avaliadas também a massa molar, grau de desacetilação, espectro por ressonância magnética nuclear e atividade antimicrobiana por disco-difusão frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 10832 e *Escherichia coli* O157:H7. Como resultados, foram verificados elevados níveis de remoção de proteína e minerais (88,31% e 91,38%, respectivamente) com os processos biotecnológicos empregados. Os resultados demonstraram que a quitosana obtidas de subprodutos industriais do caranguejo vermelho apresentou massa molar de 192 kDa, grau de desacetilação de 80,17% e atividade antimicrobiana frente aos dois micro-organismos testados com halos de inibição de 18,6 mm para *S. aureus* e 10,4 mm para *E. coli*. Com base nisso, verificou-se que a utilização de um processo misto, associando métodos biotecnológicos ao químico, mostra-se uma alternativa interessante e satisfatória, possibilitando a produção final de quitosana com menor uso de reagentes químicos e propriedades físico-químicas, estruturais e térmicas semelhantes à literatura. Em vista da atividade antimicrobiana apresentada, sugere-se a utilização da quitosana em filmes poliméricos empregados como embalagens ativas de alimentos.

Palavras-chave: Carapaças de caranguejo. Desproteínização enzimática. Desmineralização fermentativa. Quitina. Quitosana.



## 1 INTRODUÇÃO

Dentre os principais produtos de comercialização da pesca, estão os crustáceos, com expressiva produção a nível mundial e nacional (FAO, 2018; FELIPE et al., 2017). Entretanto, a industrialização de crustáceos gera uma grande quantidade de resíduos (exoesqueletos, cabeças, vísceras, dentre outros) que podem acarretar problemas para essas indústrias e para a sociedade (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016).

Os resíduos quando descartados sem nenhum tratamento apresentam alta perecibilidade e efeito poluente tanto no mar, quanto na terra. No mar, eles rapidamente levam à eutrofização, enquanto em terra causam preocupações ambientais e de saúde pública, sendo rapidamente colonizados por agentes patogênicos e organismos de deterioração (MORGANTI; MORGANTI; MORGANTI, 2011). No entanto, esses resíduos podem ser reaproveitados como subprodutos visto que eles são constituídos por vários compostos de interesse, com importância tecnológica e biológica, tais como: quitina, hidrolisados proteicos e pigmentos carotenoides (ANTUNES-VALCAREGGI; FERREIRA; HENSE, 2017). Em vista disso, o aproveitamento de subprodutos industriais do caranguejo vermelho (*Chaceon notialis*), capturado na cidade do Rio Grande, litoral sul brasileiro, e exportado para diversos países, teria um impacto positivo, ambiental e econômico, estimulando a bioeconomia da região e reduzindo problemas relacionados ao descarte dos mesmos.

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, sendo encontrada nos exoesqueletos de crustáceos, cutículas de insetos e na parede celular de fungos (ÖZOGUL et al., 2018). Industrialmente, na área médica, a quitina tem sido utilizada como linhas de sutura, na forma de nanofibras fortes e flexíveis (WU et al., 2018). Entretanto, comumente é convertida em seu derivado funcional, a quitosana.

A quitosana é o produto resultante da desacetilação da quitina, que apresenta diversas atividades biológicas interessantes como atividade antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória (ARANKU et al., 2018; ESCÁRCEGA-GALAZ et al., 2018; MORAN et al., 2018; MURAKAMI et al., 2010; YOUNES et al., 2014), dentre outras. Ela possui aplicações em diferentes áreas dependendo das suas características, tais como: filmes, géis, curativos, defensivos agrícolas, dentre outros (ELSABEE; ABDU, 2013; ESCÁRCEGA-GALAZ et al., 2018; HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016; YOUNES; RINAUDO, 2015). Convencionalmente, a quitosana é produzida utilizando processos químicos, porém estes possuem algumas desvantagens, tais como: acentuada despolimerização, produzindo oligômeros com tamanho e grau de desacetilação variados, o que provoca variações

nas suas propriedades e funcionalidades, e elevada geração de resíduos tóxicos que necessitam de um tratamento de efluentes rigoroso (GOMES et al., 2010).

Nas últimas décadas, as indústrias têm se preocupado cada vez mais em tornarem seus processos produtivos menos agressivos, especialmente no que se refere à geração e gestão de resíduos sólidos. Por isso, houve a intensificação de pesquisas que buscam processos industriais ambientalmente corretos que visam à utilização de subprodutos industriais, que são fontes de matéria-prima abundantes e baratas, bem como a redução de processos químicos (LOPES et al., 2018). Os processos biotecnológicos, utilizando enzimas e/ou fermentação microbiana, mostram-se uma alternativa promissora visto que preservam a estrutura do polímero, devido ao controle da cinética de produção com graus desejados de desacetilação, condições de processo mais amenas e redução do uso de solventes, evitando assim a formação de subprodutos indesejáveis. No entanto, o custo de produção mais elevado e o tempo de processo ainda são fatores limitantes para aplicação em larga escala. Em vista disso, para ser rentável e ambientalmente mais correto, estudos tem sugerido o emprego de processo químico associado ao biotecnológico (AHMED; IKRAM, 2017; DUN et al., 2019). O presente trabalho teve como objetivo estudar a obtenção de quitina e seu derivado funcional quitosana, utilizando os exoesqueletos do caranguejo vermelho (*Chaceon notialis*), associando processo biotecnológico ao químico, reduzindo a utilização de solventes e a geração de rejeitos altamente poluentes.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAL**

#### **2.1.1 Caranguejo vermelho**

Os subprodutos do processamento do caranguejo vermelho (*Chaceon notialis*) foram fornecidos por uma indústria pesqueira da cidade do Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. A captura destes crustáceos ocorreu no litoral sul do Rio Grande do Sul, entre agosto e setembro de 2017, sendo processados ainda em alto mar em barco fatoria. O processamento baseou-se na higienização dos caranguejos em água clorada (5 ppm), remoção das carapaças e evisceração, pesagem, congelamento, embalagem e estocagem.

As carapaças de caranguejo congeladas foram transportadas em caixas herméticas até o Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Federal do Rio Grande

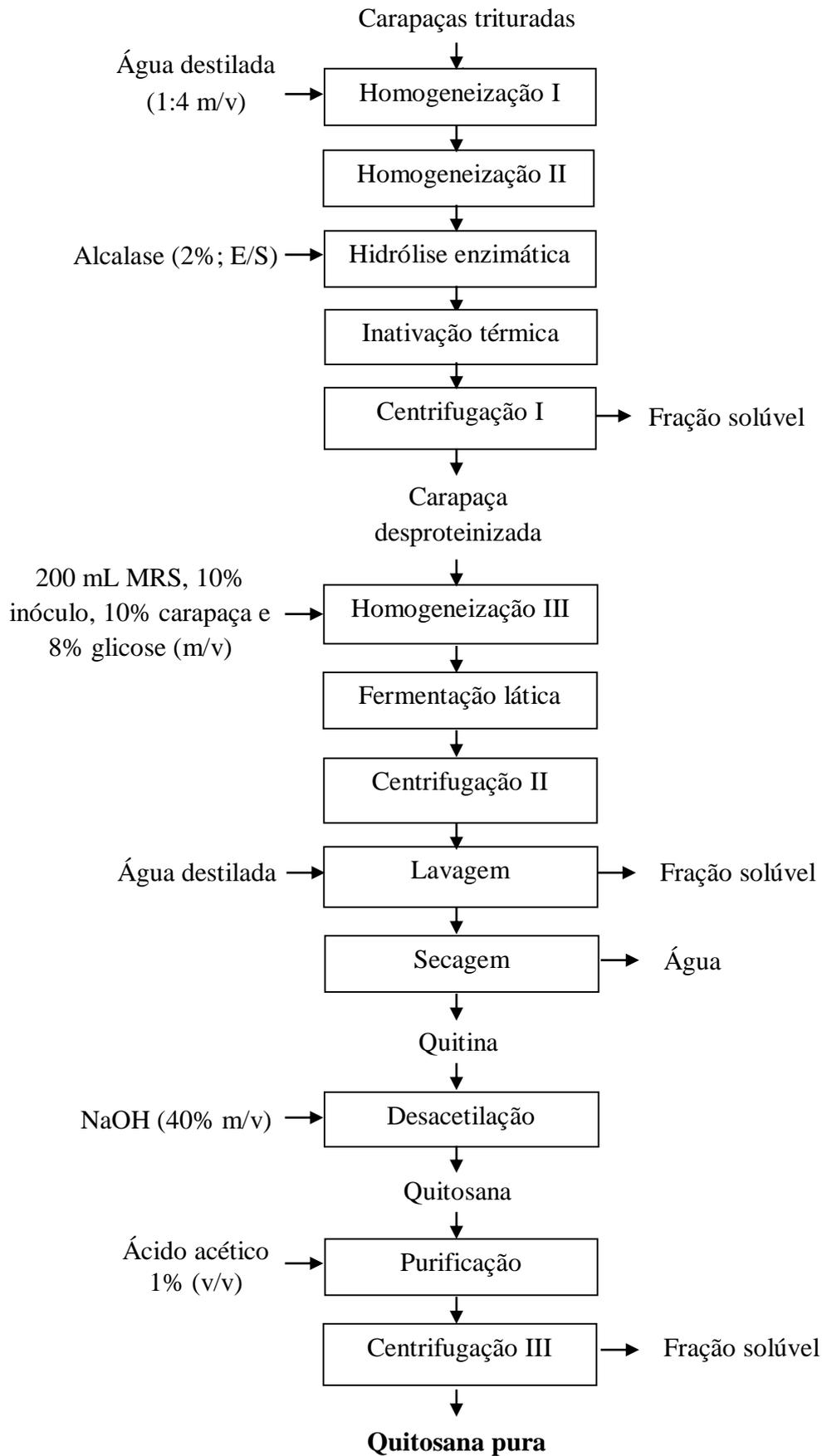
(FURG), onde foram lavadas em água corrente e secas em estufa de circulação de ar (FANEM 520, Brasil) durante 8 h a 60 °C. Em seguida, foram trituradas em processador (WALITA PS-60W, Amsterdão) e moídas em moinho de facas (MARCONI Wiley Mill – motor 1,1 kW, Brasil) e peneiradas em peneira série fina (Tyler 42), conforme descrito por Antunes-Valcareggi, Ferreira e Hense (2017). A amostra foi acondicionada em potes plásticos e armazenadas a -18 °C até o uso.

### 2.1.2 Enzimas, micro-organismos e reagentes

A partir de testes preliminares realizados com diferentes proteases (Alcalase e Protamex) (apêndice I) e bactérias produtoras de ácido lático (*Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus acidophilus*), foram escolhidas a enzima com maior eficiência na remoção das proteínas e a bactéria ácido láctica que conseguiu realizar o processo fermentativo. A enzima utilizada foi a Alcalase, uma endopeptidase bacteriana produzida a partir da fermentação submersa de *Bacillus licheniformis*, fornecida pela Novozymes Latin America (Araucária/PR). O micro-organismo utilizado na desmineralização foi *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, fornecido pelo Laboratório de Processamento de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Para a atividade antimicrobiana foram utilizados os micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 10832 e *Escherichia coli* O157:H7 disponíveis no LTA. Os reagentes utilizados no presente estudo foram de grau analítico (P.A.).

## 2.2 RECUPERAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA POR PROCESSO MISTO

A quitina foi obtida através da desproteínização das carapaças secas e trituradas por hidrólise enzimática, seguida da desmineralização por fermentação láctica, conforme descrito respectivamente por Antunes-Valcareggi, Ferreira e Hense (2017), com modificações na proporção enzima/substrato proteico e temperatura de processo, e Zhang et al. (2017), com modificações na etapa de desproteínização, concentração de glicose e tempo de processo. A reação de desacetilação da quitina para a produção de quitosana foi realizada de acordo com Moura et al. (2015) utilizando solução alcalina concentrada (NaOH 40% m/v) a  $130 \pm 2$  °C, durante 90 min, sob agitação mecânica constante (50 rpm) em reator de vidro encamisado acoplado de banho ultratermostático. A Figura 1 apresenta o fluxograma operacional do processo de recuperação dos polissacarídeos quitina e quitosana das carapaças de caranguejo vermelho (*C. notialis*).

**Figura 1** – Fluxograma operacional do processo de recuperação de quitina e quitosana

As carapaças de caranguejo trituradas foram homogeneizadas em água destilada na proporção 1:4 (m/v), em reator de vidro encamisado acoplado de banho ultratermostático (Quimis, Q212S, Brasil), sob agitação constante em agitador (Fisatom, Brasil) a 500 rpm. A enzima proteolítica utilizada foi a enzima Alcalase, sendo a temperatura ajustada no seu parâmetro ótimo de atuação (temperatura 50 °C). Como o pH das carapaças é em torno de 8,5, não foi necessário ajustar o pH para a reação. A hidrólise enzimática iniciou-se através da adição da enzima na proporção de 2% enzima/substrato (E/S). O grau de hidrólise (GH) foi monitorado de 10 em 10 min até se tornar constante, de acordo com a Equação 1 de Adler-Nissen (1986).

$$GH(\%) = \frac{B \times N_B}{\alpha \times h_{tot} \times MP} \times 100 \quad (1)$$

Onde, B é o volume da base consumida durante a hidrólise, para manter o pH constante (mL);  $N_B$  é a normalidade corrigida da base;  $h_{tot}$  é o número de ligações peptídicas (moles equiv/kg), sendo que para crustáceos este valor é 7,7 moles equiv/kg (ADLER-NISSEN, 1986); MP é a massa de proteína (g, determinado em N x fator de Kjeldahl – 6,25); e  $\alpha$  é o grau de dissociação, o qual foi determinado segundo a Equação 2 de Adler-Nissen (1986):

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK_a}}{1 + 10^{pH-pK_a}} \quad (2)$$

Onde, pH é o pH ótimo da enzima utilizada para a hidrólise; pKa é a constante de dissociação, a qual foi determinada de acordo com a temperatura utilizada para a hidrólise enzimática segundo a Equação 3, de acordo com Steinhart e Beychok (1964 citado por KRISTINSSON; RASCO, 2000).

$$pK_a = 7,8 + \frac{(298-T)}{(298 \times T)} \times 2400 \quad (3)$$

Onde, T é a temperatura em Kelvin.

Ao final da reação, as enzimas foram inativadas em banho-maria a 90 °C durante 10 min. O produto resultante do processo foi centrifugado a 9000 x g durante 20 min a 4 °C

(Hanil Supra 22K, Índia), para separar as frações solúvel (hidrolisado proteico) e insolúvel (quitina e minerais). Logo em seguida, a fração insolúvel foi conduzida para a etapa de desmineralização da amostra por fermentação.

Para a desmineralização foi utilizado o micro-organismo *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014), reativado a 37 °C em meio *Man, Rogosa e Sharpe* (MRS). Para o preparo do inóculo, a cultura microbiana foi raspada com 10 mL de água peptonada (0,1%), transferindo para Erlenmeyer de 500 mL, contendo 90 mL de caldo MRS, em incubadora refrigerada (Tecnal TE-424) a 37 °C até atingir a densidade ótica 1,0. O processo fermentativo foi realizado em frasco *Erlenmeyer* de 500 mL, contendo 200 mL de meio, inoculado com suspensão da bactéria (10%), 20 g de carapaça e 15 g de glicose, realizando o acompanhamento do pH inicial e final por fitas de pH (faixa pH de 0-14, UNIVERSAL TEST PAPER, Inglaterra). Os frascos foram mantidos em incubadora a 32 °C durante 96 h, sem agitação, com pH inicial de 6,5. Ao final da fermentação foi realizada a centrifugação do caldo fermentado a 9000 x g durante 30 min a 4 °C, separando a quitina (fase insolúvel) da fase solúvel. A quitina passou por processo de lavagem, secagem a 80 °C durante 4 h e trituradas em um liquidificador (WALITA PS-60W, Amsterdão). A amostra foi acondicionada em potes plásticos e armazenadas a -18 °C até o uso.

A reação de desacetilação da quitina foi realizada de acordo com Moura et al. (2015), utilizando solução alcalina concentrada (NaOH 40% m/v) a  $130 \pm 2$  °C, durante 90 min, sob agitação mecânica constante (50 rpm) em reator de vidro encamisado acoplado de banho ultratermostático. A quitosana foi purificada através de sua dissolução em solução de ácido acético (1%) e então centrifugada a  $9000 \times g$  durante 20 min, para retirada do material não dissolvido e obter uma solução com menor quantidade de impurezas. A precipitação total da quitosana ocorreu por adição de hidróxido de sódio (8% m/v) até pH 12,5, sendo após neutralizada até pH 7,0 com ácido clorídrico (1M). A suspensão de quitosana resultante foi novamente centrifugada, para a separação do sobrenadante, logo em seguida submetida à secagem em estufa de circulação de ar (FANEM 520, Brasil) a 90 °C por 4 h.

A eficiência de remoção nas etapas de desproteínização e desmineralização foi calculada conforme descrito por Zhang et al. (2012), com base no conteúdo final de proteínas e cinzas após os bioprocessos em comparação ao conteúdo inicial dos constituintes, sendo os resultados expressos em porcentagem. O rendimento das etapas de obtenção de quitina e quitosana foi calculado com base no balanço de massa global dos processos, segundo descrito por Moura et al. (2015).

## 2.3 CARACTERIZAÇÃO

### 2.3.1 Composição proximal

A composição proximal das carapaças de caranguejo, da quitina e da quitosana foi determinada em triplicata segundo método descrito pela AOAC (2000), quanto ao teor de proteínas (método micro-Kjedahl, nº 920.87, utilizando o fator de conversão para N-proteína de 6,25), lipídios (método Soxhlet, nº 920.85), cinzas (método nº 932.03), umidade (método nº 935.29) e carboidratos por diferença.

### 2.3.2 Cor

A cor das carapaças moídas, da quitina e da quitosana foi determinada em triplicata em colorímetro (Minolta, CR-400, Japão) utilizando o sistema de escala de cor da Comissão Internacional de Iluminação (CIE  $L^*a^*b^*$ ) (1986). As coordenadas determinadas desse sistema tridimensional foram a luminosidade ( $L^*$ ), que é acromática e varia de 0 (preto) a 100 (branco), e as coordenadas  $a^*$  e  $b^*$ , onde,  $a^*$ = coordenada do verde-vermelho ( $-a^*$ : verde,  $+a^*$ : vermelho) e  $b^*$ = coordenada azul-amarelo ( $-b^*$ : azul,  $+b^*$ : amarelo).

### 2.3.3 Solubilidade

A quitina e a quitosana foram avaliadas quanto à solubilidade por dois métodos: em solução de ácido acético 1% (v/v), utilizada posteriormente para a elaboração dos filmes e permitida em alimentos, conforme o proposto pela ASTM F2103-11 (ASTM, 2011), onde teor de sólidos insolúveis foi quantificado com base na massa do total de resíduos insolúveis retidos por filtração em comparação com a massa inicial, sendo os resultados expressos em porcentagem; visual, em cinco solventes diferentes (água, acetonitrila, acetona, clorofórmio e dimetilsulfóxido), visando também testar a solubilidade para realização de outras determinações analíticas.

### 2.3.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A calorimetria das amostras de quitina e quitosana foi determinada segundo Cestari et al. (2008) em calorímetro diferencial de varredura (Shimadzu, TA-60WS, Japão).

Aproximadamente 3 mg das amostras foram pesadas em cápsulas de alumínio e foram hermeticamente seladas. A varredura de temperatura foi realizada com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min em um intervalo de temperatura de 25 a 500 °C. A temperatura onde a decomposição iniciou e a temperatura onde finalizou foram denominadas temperatura de início ( $T_{início}$ ) e temperatura de final ( $T_{final}$ ). A temperatura máxima de decomposição foi denominada temperatura de pico ( $T_{pico}$ ), considerada a temperatura onde o fluxo de calor é máximo. A entalpia de decomposição ( $\Delta H$ ) foi calculada a partir da área do pico.

### **2.3.5 Análise termogravimétrica (TGA)**

A análise termogravimétrica da quitina e quitosana foi realizada segundo método descrito por Kumar et al. (2014) em termobalança (Shimadzu, DTG 60, Japão). As amostras de 3 mg foram aquecidas a uma taxa de 25°C/min em um intervalo de temperatura de 20 a 500 °C, sob atmosfera de nitrogênio a uma taxa de fluxo de 50 mL/min. A perda de massa foi expressa em porcentagem.

### **2.3.6 Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)**

As análises de espectroscopia no infravermelho da quitina e quitosana foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu, IR Prestige – 21 FTIR, Alemanha) segundo Kumar et al. (2014). As amostras foram homogeneizadas com brometo de potássio (KBr), na proporção 1:10 (m/m). Os espectros infravermelhos foram realizados na região espectral de 450 a 3500  $\text{cm}^{-1}$  à temperatura ambiente.

### **2.3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Os estudos da microestrutura da quitina e da quitosana foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-Sul), da Universidade Federal do Rio Grande, em microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM - 6610LV, Tóquio, Japão) operando a 10 kV. As amostras foram depositadas em suportes de alumínio (*stubs*) revestidos com uma fita condutora de carbono. Em seguida, os mesmos foram recobertos com uma fina camada de ouro em *Sputtering* (Desk, Denton Vacuum, Estados Unidos) durante 120 s. A morfologia das amostras foi observada em 30 x e em 5000 x de ampliação.

### 2.3.8 Massa molar

A massa molar da quitosana foi determinada através do método viscosimétrico utilizando um viscosímetro capilar (CANNON-FENSKE, GMBH - D65719, Alemanha), conforme Zhang e Neau (2001). Primeiramente foi determinada a viscosidade reduzida utilizando a equação de Huggins, sendo esta convertida em massa molar por meio da equação de Mark Houwink-Sakurada (Equação 4).

$$[\eta] = K.(MM)^a \quad (4)$$

Onde  $\eta$  é a viscosidade intrínseca (mL/g), MM é a massa molar (Da),  $K=1,81 \times 10^{-3}$  mL/g e  $a = 0,93$ .

### 2.3.9 Grau de desacetilação (%GD)

O grau de desacetilação (%GD) da quitosana foi determinado através de titulação ácido-base, segundo método descrito por Cai et al. (2006). Aproximadamente 0,3 g de amostra foram pesadas e dissolvidas em 30 mL de HCl 0,1 mol/L. Logo em seguida, foram adicionadas 3 gotas de indicador, titulando com solução padrão de NaOH 0,1 mol/L até mudança de coloração. O %GD foi calculado utilizando a Equação 5.

$$\%GD = \frac{203(C_1 V_1 C_2 V_2)}{42(C_1 V_1 - C_2 V_2) + m(1 - W)} \quad (5)$$

Onde  $C_1$  e  $V_1$  representam a concentração (mol/L) e o volume (mL) de HCl usado na dissolução da amostra, respectivamente;  $C_2$  e  $V_2$  representam a concentração (mol/L) e volume (mL) de NaOH gasto na titulação, respectivamente;  $m$  representa a massa da amostra (g);  $W$  representa o teor de umidade de amostra (%); 203 representa a massa da quitina (g); e 42 representa a massa molar do grupamento acetil (g).

### 2.3.10 Ressonância magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H)

O espectro de RMN-<sup>1</sup>H para a quitosana foi realizada em espectrofotômetro (BRUKER DRX400, Alemanha) no Centro Integrado de Análise (CIA), da Universidade

Federal do Rio Grande, segundo método descrito por Signini e Campana-Filho (1998). Aproximadamente 10 mg de amostra foram solubilizadas em 1 mL de solução HCl/D<sub>2</sub>O 1% (v/v), formando uma solução viscosa. Uma alíquota da solução foi colocada em tubo de 5 mm de diâmetro para análise a 20 °C. Como referência externa foi utilizado o ácido 3- (trimetilsilil)-1- propano sulfônico- d4 (TSPA da Aldrich).

## 2.4 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE

### 2.4.1 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi medida pelo método do teste disco-difusão, de acordo com o método descrito pela CLSI (2018). A zona de inibição, em meio sólido, foi utilizada para determinar o efeito antimicrobiano da quitosana frente a *Escherichia coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus* ATCC 10832. A análise foi realizada em placas de Petri descartáveis contendo o ágar *Brain Heart Infusion* (BHI), onde foram inoculados 100 µL das suspensões microbianas e espalhados com alça de Drigalski estéril, com base na turvação equivalente ao padrão de 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC/mL. Posteriormente, foram adicionados 40 µL das diferentes amostras em diferentes concentrações de 1; 2 e 4 mg/mL, em discos estéreis de papel filtro de 5 mm de diâmetro. Estes discos foram colocados no ágar inoculado, com auxílio de uma pinça estéril. Para verificar que não houve influência do solvente na atividade antimicrobiana, também foi realizado o teste com o ácido acético (0,1%) frente aos dois micro-organismos. As placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C. Após a incubação, o diâmetro da zona de inibição (halo) foi mensurado com auxílio de um paquímetro em quadruplicata e os resultados foram expressos em mm de inibição.

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de composição proximal e cor foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Os dados foram avaliados pelo software Statistica (versão 5.0, StatSoft, Inc., Tulsa, Estados Unidos).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DAS CARAPAÇAS DE CARANGUEJO VERMELHO

Os exoesqueletos de crustáceos são constituídos por  $\alpha$ -quitina, proteínas, pigmentos carotenoides e carbonato de cálcio, e apresentam diversas funções, incluindo a estabilização de todo o corpo do animal, resistência a cargas mecânicas e proteção ao meio ambiente e contra predadores (AHMED; IKRAM, 2017; CHEN et al., 2008). A Tabela 1 apresenta a composição proximal das carapaças de caranguejo vermelho (*C. notialis*).

**Tabela 1** - Composição proximal dos exoesqueletos de caranguejo vermelho

Constituinte (%)	b.u	b.s
Umidade	9,33 $\pm$ 0,07	-
Cinzas	45,21 $\pm$ 0,29	49,86 $\pm$ 0,47
Proteínas	18,91 $\pm$ 0,44	20,85 $\pm$ 0,71
Lipídios	0,88 $\pm$ 0,01	0,97 $\pm$ 0,01
Carboidratos	25,67	28,32

Onde: b.u = base úmida e b.s = base seca. Dados expressos como valores médios (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

O conteúdo de 49,86% (b.s) de cinzas do presente estudo, para as carapaças de caranguejo vermelho, foi inferior ao encontrado no estudo de Pires et al. (2017) para o caranguejo marrom (74,97% b.s) e para o caranguejo aranha (62,9% b.s). Além disso, foi verificado que o conteúdo proteico deste estudo (20,85%; b.s) foi inferior ao encontrado por Lage-Yusty et al. (2011) para o caranguejo das neves (34,2% b.s). O conteúdo de carboidratos (28,32% b.s) representa a quantidade de quitina presente nas carapaças do *C. notialis*. Desta forma, os resultados encontrados indicam que o teor estimado de quitina é condizente ao descrito pela literatura (15 a 40%) (YAN; CHEN, 2015). Os menores conteúdos de minerais e proteínas favorecem a recuperação e purificação da quitina, visto que permitem maior acessibilidade ao polissacarídeo no complexo minerais-quitina-proteínas (POSHINA et al., 2018). Além disso, as diferenças encontradas para as porcentagens dos constituintes entre o presente estudo e demais resultados relatados justifica-se pelas diferentes espécies de caranguejo utilizadas, pois as composições dependem das espécies e dentro de uma determinada espécie também apresentam mudanças sazonais e variam entre diferentes partes do exoesqueleto (BOBELMANN, 2007).

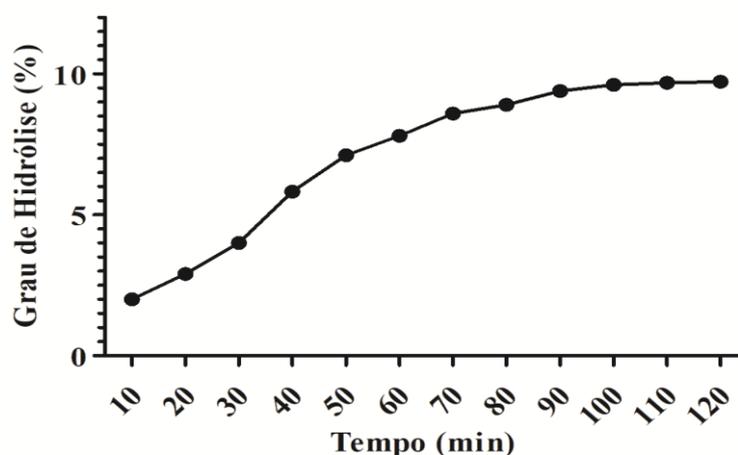
## 3.2 QUITINA

### 3.2.1 Desproteínização dos exoesqueletos de caranguejo vermelho

O uso de enzimas proteolíticas tem sido estudado com o objetivo de converter diversos subprodutos de crustáceos em produtos de alto valor agregado (LATORRES et al., 2018; SAYARI et al., 2016; YOUNES et al., 2012; YOUNES et al., 2014). No caso da recuperação de quitina dos subprodutos de crustáceos, a enzima Alcalase tem sido empregada para remover as proteínas intimamente ligadas à quitina e os minerais (HOLANDA; NETTO, 2006; LOPES et al., 2018; VALDEZ-PEÑA et al., 2010; VÁZQUEZ et al., 2017), pois apresenta elevada atividade quando submetida a uma faixa de pH 6,5 a 8,5, como é o caso dos exoesqueletos de caranguejo vermelho que apresentam pH em torno de 8,5 e temperatura de 50 a 60 °C (AGUILAR; SATO, 2018).

A Figura 2 apresenta a cinética de hidrólise para a etapa de desproteínização dos exoesqueletos. De acordo com os dados, pode-se observar que em 100 min de reação o grau de hidrólise começou a manter-se constante (9,73%-9,75%), inativando-se a reação em 120 min com grau de hidrólise máximo de 9,78%. No início da reação ocorreu a hidrólise de maior quantidade de ligações peptídicas e, após determinado período, essa quantidade reduziu até apresentar comportamento constante. Essa diminuição na taxa de reação pode ser explicada pela redução de substrato disponível ou pela inibição da atividade enzimática (KRISTINSSON; RASCO, 2000).

**Figura 2** – Cinética da hidrólise para a etapa de desproteínização dos exoesqueletos de caranguejo vermelho



Comportamento similar ao deste estudo para a cinética de hidrólise foi encontrado por Antunes-Valcareggi, Ferreira e Hense (2017), quando hidrolisaram as carapaças do siri azul (*Callinectes sapidus*), utilizando a enzima Alcalase na proporção 3 e 1% (E/S). As cinéticas apresentaram taxa inicial rápida e etapa estacionária em 120 min, para ambas as concentrações de enzima testadas. Entretanto, obtiveram maior grau de hidrólise (GH), alcançando em torno de 30% para a concentração 3% (E/S). As diferenças entre o GH do presente estudo e o resultado relatado podem ocorrer devido as espécies utilizadas serem diferentes, assim como a relação enzima/substrato, pH e temperatura, visto que as enzimas atuam de forma distinta na clivagem de ligações peptídicas em diferentes condições (VILLAMIL; VÁQUIRO; SOLANILLA, 2017).

### 3.2.2 Desmineralização dos exoesqueletos de caranguejo vermelho

A fermentação utilizando bactérias produtoras de ácido láctico (BAL) é uma abordagem promissora para a recuperação de quitina a partir de subprodutos de crustáceos (KAUR; DHILLON, 2015). Algumas espécies do gênero *Lactobacillus*, dentre elas *L. plantarum*, produzem altas concentrações de ácido láctico (AL), gerando uma condição de baixo pH (GORTARI; HOURS, 2013; MAO et al., 2013). O carbonato de cálcio presente nos exoesqueletos de caranguejo reage com o ácido láctico produzido durante a fermentação láctica, levando à formação de lactato de cálcio precipitável, que é separável por lavagem e centrifugação da fração de quitina (ARBIA et al., 2013). A Figura 3 apresenta o processo fermentativo, onde foi possível observar a ocorrência da fermentação pela produção de biomassa, que está no fundo do *Erlenmeyer*.

**Figura 3** – Processo fermentativo para desmineralização dos exoesqueletos do caranguejo vermelho



A eficiência na etapa de remoção dos minerais dos exoesqueletos de crustáceos é influenciada por vários fatores, incluindo concentração de glicose, tamanho de partícula, pH inicial, temperatura e tempo de fermentação (PACHECO et al., 2011). Assim, para garantir uma elevada desmineralização, foi necessário ajustar as condições de fermentação. Durante a fermentação realizou-se o acompanhamento do pH inicial e final do processo. Inicialmente, foram testadas diferentes condições, como a adição de carapaças cruas, antes do processo de desproteínização, adição das carapaças desproteínizadas e um teste ajustando o pH inicial de 6,5 para 5 com a adição de ácido. Entretanto, foi verificado que o processo com as carapaças desproteínizadas apresentou menor pH final (3,0), sendo escolhido como melhor condição para realização da desmineralização, visto que o baixo pH favorece as reações, além de suprimir o crescimento de micro-organismos deteriorantes (ARBIA et al., 2013).

Castro, Guerrero-Legarreta e Bórquez (2019) avaliaram a obtenção de quitina de *Allopetrolisthes punctatus*, uma espécie de caranguejo capturada no Chile e no Peru, a partir da fermentação com *Lactobacillus plantarum* sp. 47, isolada de salmão-prateado. Os parâmetros de fermentação (fonte de carbono, concentração de inóculo e temperatura de incubação) para obter um pico de produção de ácido lático e crescimento foram estudados. As condições ideais de fermentação foram 10% de inóculo, 15% de glicose e 85% de carapaças de caranguejo, em 60 h, diferentemente deste estudo onde foram utilizadas condições 10% de inóculo, 7,5% de glicose e 10% de carapaças de caranguejo, em 96 h.

Dun et al. (2019) estudaram um processo biotecnológico para a extração de quitina dos exoesqueletos de lagostim utilizando *Bacillus coagulans* LA204 para fermentação láctica e proteinase K para a hidrólise enzimática. O processo conduzido a 50 ° C com 5% de (m/v) de carapaças de lagostim, 5% (m/v) de glicose, 1000 U proteinase K/g de carapaças e 10% de inoculação de *B. coagulans* LA204, após 48 h, apresentou eficiência de desproteínização e de desmineralização de 93% e 91%, resultados próximos ao deste estudo, onde a hidrólise enzimática apresentou eficiência de remoção das proteínas de 88,31%, seguida da fermentação láctica que apresentou eficiência de remoção dos minerais de 91,68%, indicando que os processos biotecnológicos aplicados mostram-se eficientes para a purificação de quitina a partir de subprodutos industriais de crustáceos, com rendimento global de quitina de 55,8%.

### 3.2.3 Composição proximal da quitina

A Tabela 2 apresenta a composição proximal para a quitina recuperada dos exoesqueletos de caranguejo vermelho utilizando processos biotecnológicos. O teor de cinzas

e de proteínas estabelece um critério de pureza para quitina e quitosana. Entretanto, esse grau de pureza varia conforme as aplicações do polímero (ANTONINO et al., 2017).

**Tabela 2** – Composição proximal da quitina obtida dos exoesqueletos de caranguejo vermelho

Constituinte (%)	b.u	b.s
Umidade	8,70 ± 0,10	-
Cinzas	3,76 ± 0,06	4,11 ± 0,07
Proteína	2,21 ± 0,51	2,42 ± 0,56
Lipídios	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Carboidratos	85,26	93,40

Onde: b.u = base úmida e b.s = base seca. Dados expressos como valores médios (média ± desvio padrão, n=3).

A partir da Tabela 2 foi possível observar que a quitina não apresentou-se completamente pura após as etapas de desproteínização e desmineralização, com teor de cinzas e proteínas de 3,76% e 2,21%, respectivamente. Para a quitina destinada à produção de quitosana, um teor de impurezas reduzido pode ser verificado visto que no processo de desacetilação, seguido de uma nova etapa de purificação, estes minerais e proteínas poderão ser removidos (MOURA et al., 2015). Moura et al. (2006), avaliando a composição proximal da quitina, obtida dos exoesqueletos de siri por método químico, encontraram eficiência de remoção dos minerais de 99,5%, maior que o encontrado neste estudo. Entretanto, os autores encontraram eficiência de remoção das proteínas de 44,56%, quase duas vezes menor que o encontrado neste estudo, ressaltando a eficiência da hidrólise enzimática como método de desproteínização.

### 3.3 QUITOSANA

#### 3.3.1 Composição proximal, massa molar e grau de desacetilação

A Tabela 3 apresenta a composição proximal da quitosana produzida através da desacetilação química da quitina proveniente de subprodutos industriais do caranguejo vermelho.

**Tabela 3** – Composição proximal da quitosana

<b>Constituintes (%)</b>	<b>b.u</b>	<b>b.s</b>
Umidade	7,9 ± 0,07	-
Cinzas	1,3 ± 0,10	1,42 ± 0,11
Proteínas	0,89 ± 0,33	0,96 ± 0,36
Lipídios	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Carboidratos	89,89	97,60

Onde: b.u = base úmida e b.s = base seca. Dados expressos como valores médios (média ± desvio padrão, n=3).

A partir da Tabela 3 foi possível observar que a quitosana produzida apresentou teor residual de cinzas e proteínas de 1,4% e 0,9%, respectivamente. Comercialmente a quitosana encontra-se em vários graus de pureza, massa molar e grau de desacetilação, conforme a aplicação que é destinada. O grau de pureza da quitosana é um fator que afeta as propriedades biológicas, a biodegradabilidade, a solubilidade e a estabilidade do polímero (SZYMAŃSKA; WINNICKA, 2015). Para aplicações médicas e farmacêuticas, por exemplo, exige-se um grau de qualidade e pureza com teor de cinzas menor que 1% e teor de proteínas não detectável (ANTONINO et al., 2017). Em vista disso, observa-se que os resultados deste estudo foram próximos a este parâmetro.

De acordo com Moura et al. (2015), as variações nos métodos de obtenção da quitosana resultam em diferenças no grau de desacetilação, na distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia principal e também na massa molar, influenciando diretamente nas propriedades e funcionalidades do polímero. A quitosana produzida neste estudo apresentou massa molar média de 192 kDa e grau de desacetilação de 80,17%. As aplicações e características da quitosana dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e do tamanho da cadeia polimérica. O grau de desacetilação é reportado na literatura na faixa de 50 a 95% e influencia não só as propriedades físico-químicas, como conformação e a tensão de ruptura da molécula, mas também suas propriedades bioativas, tais como atividade antimicrobiana e antioxidante, por apresentar mais grupos amínicos livres disponíveis para interações. As propriedades bioativas também estão intimamente relacionadas com o tamanho da cadeia, onde quitosanas com tamanho em torno de 2-200 kDa são consideradas mais fortemente ativas (VINSOVA; VAVRIKOVA, 2008). Sendo assim, quitosanas com massas molares médias e graus de desacetilação elevados apresentam atividades biológicas mais efetivas que as de alta massa molar e graus de desacetilação reduzidos (MOURA et al., 2015;

KNIDRI et al., 2018). Sendo assim, considera-se satisfatórias as características da quitosana produzida comparando-se ao reportado na literatura.

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA

#### 3.4.1 Cor

As características de cor diferiram significativamente entre a carapaça moída, a quitina e a quitosana, conforme apresenta a Tabela 4.

**Tabela 4** – Parâmetros de cor da carapaça moída, quitina e quitosana

Amostra	$L^*$	$a^*$	$b^*$
Carapaça	$70,48 \pm 0,25^b$	$2,46 \pm 0,04^b$	$10,33 \pm 0,1^c$
Quitina	$58,31 \pm 0,68^c$	$5,95 \pm 0,07^a$	$17,56 \pm 0,02^b$
Quitosana	$74,78 \pm 0,86^a$	$2,04 \pm 0,02^c$	$21,75 \pm 0,21^a$

Dados expressos como valores médios (média  $\pm$  desvio padrão, n=3). Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferenças significativas entre as amostras através do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A quitina apresentou a luminosidade ( $L^*$ ) de 58,31, a qual foi significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) em relação à carapaça moída e a quitosana produzida. Entretanto, apresentou valor significativamente superior ( $p < 0,05$ ) de  $a^*$  (5,95) entre todos os pós. Os valores de  $a^*$  e de  $b^*$  (17,56) encontrados para a quitina indicam uma coloração mais avermelhada e escura do pó. Essa característica de cor pode estar relacionada à ocorrência da reação de Maillard, entre os grupos funcionais do aminopolissacarídeo (grupos aldóico  $-\text{COH}$  e amina  $-\text{NHR}$ ), durante o processo de esterilização do meio para o processo fermentativo, contribuindo para o escurecimento da amostra e para a coloração amarelada da quitosana produzida ( $b^*$  21,75) (SZYMÁNSKA; WINNICKA, 2015).

Características similares ao deste estudo foram encontradas por Yen, Yang e Mau (2009), quando avaliaram quitina e quitosana de carapaças de caranguejo. Valores próximos de  $L^*$  (50,3) e de  $b^*$  (18,5) demonstram uma coloração amarelada para a quitina bruta que se intensificou com a reação de desacetilação, conferindo à quitosana uma coloração bege/marrom, semelhante à deste estudo, em virtude do tempo de reação e temperatura elevada utilizadas no processo. Portanto, os autores também verificaram que uma coloração escura é conferida quanto maiores os tempos de processo e as temperaturas aplicadas, visto a ocorrência de reações de escurecimento, como Maillard.

### 3.4.2 Solubilidade

A Tabela 5 apresenta a avaliação visual da solubilidade das amostras de quitina e quitosana. A quitina não apresentou solubilidade frente a nenhum dos solventes testados. Entretanto, a quitosana, a forma desacetilada da quitina, apresentou solubilidade em todos os solventes, exceto em água.

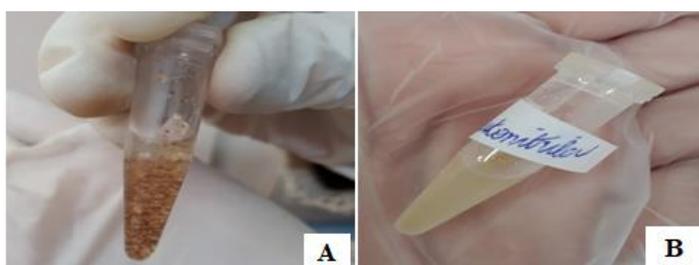
**Tabela 5** – Avaliação visual da solubilidade dos polímeros

Solvente	Quitina	Quitosana
Água	--	--
DMSO	--	+
Acetonitrila	--	+
Acetona	--	+
Clorofórmio	--	+

Onde: -- insolúvel, - parcialmente solúvel e + solúvel.

A solubilidade é uma das propriedades que permite caracterizar e diferenciar estes polissacarídeos, visto que a quitina é conhecida por ser altamente insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos. Isto se deve a propriedade hidrofóbica do grupo acetila, que contribui para a formação de ligações de hidrogênio que estabilizam a estrutura da quitina. As cadeias de quitina apresentam-se como fitas que se empacotam lado a lado em uma forma cristalina altamente ordenada, requerendo elevada energia para a quebra das ligações formadas, impedindo a associação com moléculas de água e com a maioria dos solventes (ROY et al., 2017). Quando desacetilada, denominada de quitosana, parte das ligações N-acetil são rompidas, formando unidades de D-glicosamina que contém um grupo amino livre, aumentando a solubilidade o polímero em meios aquosos (SIVASHANKARI; PRABAHARAN, 2017). A Figura 4 mostra a quitina (A) insolúvel, precipitada, e a quitosana (B) solubilizada.

**Figura 4** – Avaliação visual da solubilidade da quitina (A) e da quitosana (B) produzida



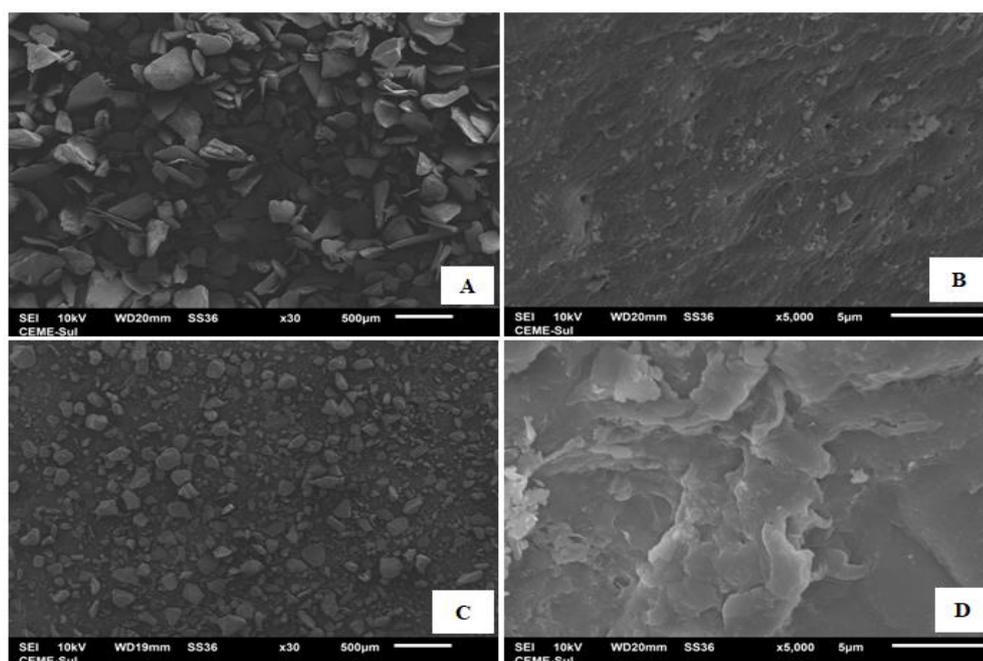
(A) Análise de solubilidade frente aos solventes orgânicos. (B) Quitina insolúvel. (C) Quitosana solubilizada.

Na avaliação da solubilidade dos polímeros em solução de ácido acético, foi verificada solubilidade de 2,9% para a quitina e de 99,5% para a quitosana. Anand et al. (2014) encontraram valores de solubilidade (96,3%) próximos ao deste estudo quando avaliaram quitosana, diluída em ácido acético, proveniente de subprodutos de caranguejo capturado no Sul da Índia, Toan e Hanh (2013) estudaram as características e a aplicação de quitosana, produzida a partir de cascas de camarão, verificando 99% de solubilidade também em solução de ácido acético 1% (m/v), sendo o grau de desacetilação 88% e a massa molar 174 kDa. Segundo Özogul et al. (2018), a distribuição dos grupos acetamida e amina ao longo das cadeias poliméricas, conjuntamente com o grau de acetilação/desacetilação e a massa molar, influenciam diretamente a solubilidade do polissacarídeo.

### 3.4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica que possibilita a obtenção de imagens com poder de resolução elevado, permitindo a análise dos aspectos estruturais dos materiais (ANTONINO et al., 2017). A Figura 5 apresenta as MEV da quitina e da quitosana, onde foi possível comprovar que a reação de desacetilação modifica a estrutura do polissacarídeo, conferindo características estruturais distintas aos polímeros.

**Figura 5** – Microscopia eletrônica de varredura da quitina (A-B) e da quitosana (C-D)



Quitina (A) e Quitosana (C) em 30 x de ampliação. Quitina (B) e Quitosana (D) em 5000 x de ampliação.

A quitina apresentou diâmetro de partícula de 253,91  $\mu\text{m}$  e a superfície compacta, densa e homogênea, apenas com pequenos poros (Figura 5 A e B). Segundo Berger et al. (2014), esta morfologia é resultante da estrutura cristalina da quitina, em função do empacotamento da cadeia ocasionado pelas fortes ligações inter e intramoleculares. A quitosana apresentou diâmetro de 134,42  $\mu\text{m}$  e a superfície exibiu uma estrutura mais fragmentada, condizente com a remoção dos grupamentos acetil que torna a estrutura semicristalina e mais disponível para interações (Figura 5 C e D).

### 3.4.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Para a definição das aplicações de biopolímeros, o conhecimento de sua degradação térmica tem extrema importância (MOUSSOUT et al., 2016). A Tabela 6 apresenta as temperaturas de início ( $T_{\text{início}}$ ), final ( $T_{\text{final}}$ ) e máxima ( $T_{\text{pico}}$ ), bem como a energia térmica (entalpia,  $\Delta H$ ) necessária para que a degradação dos polissacarídeos produzidos.

**Tabela 6** – Calorimetria diferencial de varredura (DSC) para quitina e quitosana produzida

Parâmetros	Quitina	Quitosana
$T_{\text{início}1}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	58,28	59,81
$T_{\text{pico}1}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	79,89	78,89
$T_{\text{final}1}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	112,20	102,79
$\Delta H_1$ (J/g)	-7,86	-7,10
$T_{\text{início}2}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	185,65	176,64
$T_{\text{pico}2}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	193,10	208,98
$T_{\text{final}2}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	199,38	197,94
$\Delta H_2$ (J/g)	-5,87	-3,66
$T_{\text{início}3}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	382,37	314,74
$T_{\text{pico}3}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	422,01	317,48
$T_{\text{final}3}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	418,63	310,53
$\Delta H_3$ (J/g)	17,34	11,80
$\Delta H_{\text{total}}$ (J/g)	3,61	1,04

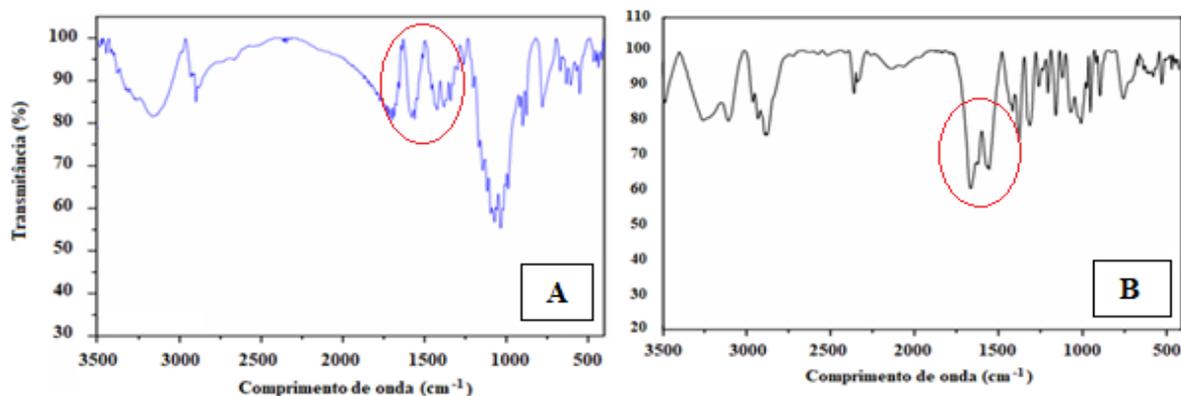
De acordo com Kittur, Prashanth e Tharanathan (2002) a energia térmica (entalpia,  $\Delta H$ ) correlaciona-se com a compactação da estrutura dos polímeros, ou seja, quanto maior a entalpia do pico, mais cristalino. Com base nos dados da Tabela 6, foi possível confirmar este

comportamento, visto que o maior  $\Delta H_{\text{total}}$  (3,61 J/g) foi verificado para a quitina, que apresenta estrutura cristalina altamente ordenada, necessitando de maior energia térmica para a dissociação das fortes ligações de hidrogênio e decomposição da cadeia polissacarídica. Segundo os autores, cada temperatura de pico endotérmico ou exotérmico e área de pico muda em função das estruturas primárias da macromolécula, ou seja, durante a decomposição a temperatura e a entalpia sofrem modificações em função do teor de grupamentos acetil (grau de acetilação) que são mais estáveis que os grupos amina. A quitosana, em virtude do processo de desacetilação empregado, apresenta estrutura semicristalina e prevalência de grupos amina. Por isso, avaliando a entalpia ( $\Delta H_{\text{total}}$  1,04 J/g) e a temperatura do pico de decomposição ( $T_{\text{pico3}}$  317,48 °C), foi verificado que a quitosana apresenta menor estabilidade térmica visto que necessita de menor energia e temperatura. Kimura et al. (2016), avaliando quitosana comercial, com grau de desacetilação 82%, verificaram temperatura e entalpia de decomposição de 296,68 °C e 198,83 J/g, respectivamente. As variações encontradas para os resultados do presente estudo e o resultado descrito justificam-se devido as diferentes matérias-primas utilizadas na produção de quitosana, uma vez que as quitosanas comerciais, em geral, são oriundas de subprodutos de camarão, e diferentes métodos de produção que alteram estruturalmente os polímeros, com graus de desacetilação distintos, conferindo características diversificadas (YEN; YANG; MAU, 2009).

### 3.4.5 Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)

A espectroscopia no infravermelho pode ser usada para caracterizar amostras de quitina e quitosana, pois ambas possuem bandas características de grupos funcionais inerentes a cada tipo de amostra (PRABU; NATARAJAN, 2012). De acordo com a Figura 6, que apresenta a FTIR da quitina (A) e da quitosana (B), foi possível observar que os perfis demonstraram diferenças para as amostras estudadas. No espectro da quitosana (8B) ocorre uma diminuição nos picos nas faixas referentes as bandas amida II e I (1500-1655  $\text{cm}^{-1}$ ), em virtude da deformação  $\text{NH}_2$ . Em alguns trabalhos (CAMPANA-FILHO et al., 2007; CAHÚ, et al., 2012; SAGHEER et al., 2009), as mudanças espectrais nessa região estão associadas ao aumento do grau de desacetilação da amostra. Devido à prevalência de grupos  $-\text{NH}_2$  disponíveis após a desacetilação da quitina, a banda em torno de 1655  $\text{cm}^{-1}$  diminui gradualmente, sendo considerada uma mudança útil para diferenciar quitina e seu derivado funcional, a quitosana (KUMIRSKA et al., 2010).

**Figura 6** - Espectros de absorção da região do infravermelho da quitina (A) e quitosana (B)



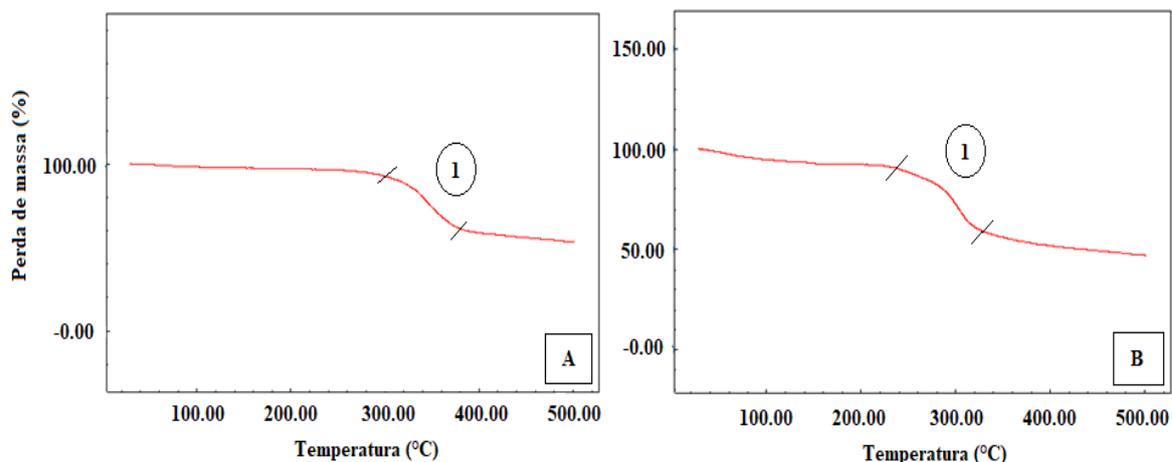
Comportamento similar, ao deste estudo, foi encontrado por Antunes-Valcareggi, Ferreira e Hense (2017), que obtiveram quitina por hidrólise enzimática das carapaças de siri azul (*Callinectes sapidus*), encontrando pico mais elevado na banda amida I em  $1590\text{ cm}^{-1}$ . Segundo os autores, esse comportamento indica que a quitina extraída das carapaças de siri adota a estrutura polimórfica da  $\alpha$ -quitina, que é a forma mais abundante e estável deste polissacarídeo.

Sugiyanti et al. (2018), avaliando quitosana proveniente dos exoesqueletos de caranguejos pertencentes a família *Portunidae*, observaram as vibrações de curvatura NH dos grupos  $\text{-NH}_2$ , em comprimentos de onda de  $1375\text{ cm}^{-1}$ , resultando em uma diminuição na absorção em  $1311\text{ cm}^{-1}$ , indicando a perda de grupos acetil.

### 3.4.6 Análise termogravimétrica (TGA)

Os métodos térmicos, como a termogravimetria (TGA), surgiram como poderosas técnicas termoanalíticas para monitorar mudanças físicas e químicas características em polímeros naturais e sintéticos. Esses métodos produzem curvas que são exclusivas para uma composição particular de matéria e até mesmo pequenas mudanças na estrutura e composição química trarão variações reprodutíveis nos termogramas (KITTUR; PRASHANTH e THARANATHAN, 2002). Segundo Zouhuriaan e Shokrolahi (2004), a perda de massa para quitina e quitosana ocorre principalmente pela degradação da cadeia polimérica, ocasionada pelo processo de despolimerização e decomposição da estrutura sacarídica pelo calor, liberando moléculas menores como água, amônia e dióxido de carbono. A Figura 7 apresenta os termogramas da TGA da degradação térmica da quitina e da quitosana.

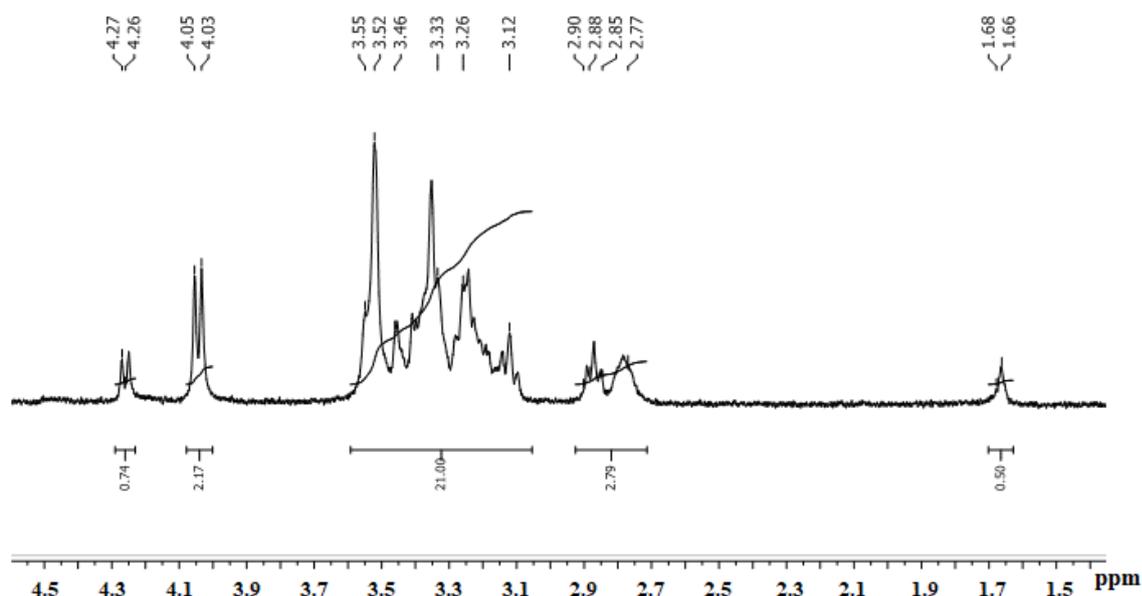
**Figura 7** - Análise termogravimétrica (TGA) da quitina (A) e da quitosana (B)



A perda de massa para a quitina foi 27,16%, verificada entre 308,11 °C a 366,16 °C, conforme apresentado na Figura 7A. De acordo com os resultados de DSC, apresentados anteriormente, a quitina requer mais energia para a decomposição oxidativa do polímero, visto sua estrutura altamente ordenada, sendo condizente a maior perda de massa. A quitosana apresentou perda de massa de 36,55%, observada entre 248,28 °C a 321,93 °C, conforme apresentado na Figura 7B. Resultado próximo ao deste estudo foi verificado por Kimura et al. (2016) avaliando quitosana comercial com grau de desacetilação 82%. Os autores relataram perda de massa de 32% em 300 °C, atribuindo a redução na estabilidade térmica em temperaturas mais altas às alterações na estrutura polissacarídica e a ruptura das ligações intermoleculares de baixa energia. Assim, as diferentes características observadas para quitina e quitosana justificam-se pelo processo de desacetilação empregado que modifica estruturalmente o polímero.

### 3.4.7 Ressonância magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H)

Quando a fração de unidades de glicosamina é superior a 50%, o polímero é comumente chamado de quitosana. A quitina, por outro lado, é o termo empregado quando as unidades de N-acetil-glicosamina são superiores a 50% (RINAUDO, 2006). A Figura 8 apresenta o espectro obtido pela técnica RMN-<sup>1</sup>H, para a amostra de quitosana. Essa análise não pode ser realizada para a quitina devido sua insolubilidade no solvente utilizado nessa técnica, conforme descrito no item 3.4.2.

**Figura 8** – Espectro de RMN-<sup>1</sup>H para a amostra de quitosana

O pico verificado no espectro em 1,7 ppm é do tipo singlete e corresponde ao hidrogênio da metila do grupo acetamida, portanto corresponde aos prótons da unidade N-acetil-glicosamina (GlcNAc). Além disso, foi verificado em 2,9 ppm um pico do tipo tripleto que representa o hidrogênio localizado na posição 2 do anel glicosamino e picos superpostos em 3,1 a 3,5 ppm e dois picos dupletos em 4 e 4,2 (ppm) que indicam os hidrogênios ligados aos carbonos 3, 4, 5 e 6 do anel glicosamino, referindo-se aos prótons da unidade glicosamina (GlcN)(QUEIROZ et al., 2015). Desta forma, os prótons identificados em sua maioria, bem como o tamanho dos picos mais acentuados, referem-se à unidade desacetilada glicosamina (GlcN), que caracterizam o polímero como quitosana.

Kasaai (2010) estudaram os espectros de RMN-<sup>1</sup>H para quitosana verificando um pico em 2,0-2,1 ppm representando os prótons de N-acetil-glicosamina (GlcNAc) e um pico em 3,1-3,2 ppm que representa os prótons de resíduos de glicosamina (GlcN). No referido estudo também verificaram sinais de prótons que se sobrepõem parcialmente, gerando uma ampla faixa de sinais associados no meio do espectro, resultado semelhante ao deste estudo.

### 3.4.8 Atividade antimicrobiana

O método disco-difusão baseia-se na avaliação do tamanho do halo de inibição, onde o aumento no tamanho resulta de uma amostra com potencial antimicrobiano superior, devido à difusão do composto ativo no meio, resultando em um halo onde não há multiplicação

microbiana (CLSI, 2018). A Tabela 8 apresenta os halos de inibição (mm) apresentados pela quitosana frente a *S. aureus* (gram-positivo) e *E. coli* (gram-negativo).

**Tabela 7** – Atividade antimicrobiana da quitosana produzida

Concentração de quitosana (mg/mL)	Halo de inibição (mm)	Halo de inibição (mm)
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
1	18,6 ± 1,15 <sup>aA</sup>	10,4 ± 0,63 <sup>aB</sup>
2	12,0 ± 0,00 <sup>bA</sup>	7,8 ± 0,20 <sup>bB</sup>
4	8,8 ± 0,26 <sup>cA</sup>	6,0 ± 0,00 <sup>cB</sup>

Média±desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as concentrações testadas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os micro-organismos testados ( $p < 0,05$ ) pelo teste t-student.

Os micro-organismos *S. aureus* e *E. coli* foram inibidos por todas as concentrações de quitosana testadas, diferindo estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ). Com base nos resultados encontrados, não foi verificada a tendência entre o acréscimo na inibição dos micro-organismos com o aumento na concentração de quitosana. A amostra de menor concentração (1 mg/mL), obteve maior potencial antimicrobiano, com os maiores halos de inibição (18,6 mm) para *S. aureus*, como pode-se observar na Figura 9. Para a solução de ácido acético 0,1%, utilizada como solvente, foi realizado um controle frente aos dois micro-organismos, onde não obteve-se nenhum halo de inibição. A quitosana é um polímero que tem despertado atenção como potencial agente antimicrobiano frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos, entre outros. Devido à carga positiva, o polissacarídeo pode interagir facilmente com as membranas celulares microbianas, que são carregadas negativamente, levando o micro-organismo a morte (MOUSAVI KHANEGHAH; HASHEMI; LIMBO, 2018).

**Figura 9** – Avaliação da atividade antimicrobiana em diferentes concentrações de quitosana



(a) Disco-difusão com ácido acético 0,1% usado como controle frente a *E. coli* O157:H7. (b) Disco-difusão na concentração 4 mg/mL de quitosana frente a *E. coli* O157:H7. (c) Halo de inibição ampliado obtido com quitosana 1 mg/mL frente ao *S. aureus*.

Goy et al. (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana da quitosana e seu derivado quaternizado na inibição de *E. coli* e *S. aureus* pelo método de turbidez do meio e também encontraram uma redução na atividade antimicrobiana à medida que a quantidade de polímero aumentava, além de uma diminuição da atividade frente ao micro-organismo gram-negativo. Esse comportamento frente aos micro-organismos gram-negativos justifica-se pela parede celular delgada que os mesmos possuem, com estrutura adicional, chamada de membrana externa, que dificulta a difusão de compostos antimicrobianos para o interior da célula para posterior rompimento da mesma (SEDAGHATI et al., 2016). A diminuição do potencial antimicrobiano em maiores concentrações de quitosana baseia-se no arranjo espacial das cadeias poliméricas, ou seja, baixas concentrações de polímero produzem uma melhor distribuição molecular no solvente, diminuindo a interação entre as cadeias vizinhas, deixando disponíveis os grupos carregados para atuação frente aos micro-organismos (PALERMO; KURODA, 2010). Quando a concentração aumenta, a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos funcionais das cadeias de quitosana é facilitada, reduzindo a dispersão e levando a estrutura a assumir uma conformação enrolada densamente sobreposta, conseqüentemente um número menor de locais carregados estará disponível, impedindo assim a ligação com as paredes das células microbianas (HALABALOVA et al., 2011).

Silalahi et al. (2016) avaliando a atividade antimicrobiana da quitosana (2% e 1% p/v), solubilizada em ácido acético 1% (v/v), frente aos micro-organismos *E. coli* e *B. cereus*, observaram halos de inibição para a concentração 2% (p/v) de 6,23 e 6,26 mm, respectivamente, sendo menores que os do presente estudo e verificando o mesmo comportamento de Goy et al. (2016) em relação a redução da atividade antimicrobiana com o aumento da concentração.

#### **4 CONCLUSÃO**

Um processo misto para recuperação de quitina e para produção final de quitosana a partir de subprodutos do caranguejo vermelho (*C. notialis*) foi aplicado e mostrou-se uma alternativa eficiente e satisfatória. O processo biotecnológico removeu elevados níveis de proteína e minerais (88,31% e 91,38%), propiciando a produção de quitosana com reduzida geração de rejeitos tóxicos e agressivos ao meio ambiente. Foi possível identificar e distinguir a quitina e a quitosana, em função das características estruturais de cada polímero, principalmente em virtude das mudanças ocorridas no processo de desacetilação. As propriedades físico-químicas, estruturais e térmicas da quitina e da quitosana foram avaliadas

e semelhantes ao reportado na literatura, demonstrando propriedades tecnológicas e bioativas atraentes. A quitosana apresentou massa molar de 192 kDa, elevado grau de desacetilação (80,17%) e excelente atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos *S. aureus* (18,6 mm) e *E. coli* (10,4 mm), demonstrando potencial para aplicação em filmes bioativos para o prolongamento da vida útil de alimentos.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN, J. **Enzymatic hydrolysis of food proteins**. London: Elsevier Applied Science Publishing, 1986. 283 p.

AGUILAR, J. G. S.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2018.

AHMED, S.; IKRAM, S. **Chitosan derivatives, composites and applications**. Berverly: Scrivener Publishing, 2017. 503 p.

ANAND, M.; KALAIVANI, R.; MARUTHUPANDY, M.; KUMARAGURU, A. K.; SURESH, S. Extraction and characterization of chitosan from marine crab and squilla collected from the Gulf of Mannar Region, South India. **Journal of Chitin and Chitosan Science**, v. 2, p. 1-8, 2014.

ANTONINO, R. S. C. M. Q.; FOOK, B. R. P. L.; LIMA, V. A. O.; RACHED, R. I. F.; LIMA, E. P. N.; LIMA, R. J. S.; COVAS, C. A. P.; FOOK, M. V. L. Preparation and characterization of chitosan obtained from shells of shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). **Marine Drugs**, v. 15, n. 5, p. 141-150, 2017.

ANTUNES-VALCAREGGI, S. A.; FERREIRA, S. R.S; HENSE, H. Enzymatic hydrolysis of Blue Crab (*Callinectes Sapidus*) waste processing to obtain chitin, protein, and astaxanthin-enriched extract. **International Journal of Environmental & Agriculture Research**, v. 3, p. 81-92, 2017.

AOAC. **Official methods of analysis**. 17 ed. Maryland: Association off Official Analytical Chemistry, 2000.

ARANKU, M.; GEBICKI, J. M.; IOHARA, D.; TOMIDA, H.; UEKAMA, K.; MARUYAMA, T.; HIRAYAMA, F.; OTAGIRI, M. Antioxidant activities of chitosans and its derivatives in *in vitro* and *in vivo* studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, p. 141-149, 2018.

ARBIA, W.; ARBIA, L.; ADOUR, L.; AMRANE, A. Chitin extraction from crustacean shells using biological methods - A review. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 12-25, 2013.

ASTM. Standard guide for characterization and testing of chitosan salts as starting materials intended for use in biomedical and tissue engineered. **In: Annual Book of ASTM Standards**,

**American Society for Testing and Materials, Designation F2103-11**, West Conshohocken: ASTM International 2011.

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD-ARNAUD, T. M.; ALCÂNTARA, S. R. C.; SILVA, A. C.; SILVA, A. M.; NASCIMENTO, A. E.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Green conversion of agroindustrial wastes into chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* strains. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 9082-9102, 2014.

BOßELMANN, F.; ROMANO, P.; FABRITIUS, H.; RAABE, D.; EPPLE, M. The composition of the exoskeleton of two crustacea: The American lobster *Homarus americanus* and the edible crab *Cancer pagurus*. **Termochimica Acta**, v. 463, p. 65-68, 2007.

CAHÚ, T. B.; SANTOS, S. D.; MENDES, A.; CÓRDULA, C. R.; CHAVANTE, S. F.; CARVALHO JR., L. B.; NADER, H. B.; BEZERRA, R. S. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 570-577, 2012.

CAI, J.; YANG, J.; DU, Y.; FAN, L.; QIU, Y.; LI, J.; KENNEDY, J.F. Enzymatic preparation of chitosan from the waste *Aspergillus niger* mycelium of citric acid production plant. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 151-157, 2006.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de alfa e beta-quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.

CASTRO, R.; GUERRERO-LEGARRETA, I.; BÓRQUEZ, R. Chitin extraction from *Allopetrolisthes punctatus* crab using lactic fermentation. **Biotechnology Reports**, v. 20, p. 112-118, 2019.

CESTARI, A.R.; VIEIRA, E.F.S.; TAVARES, A.M.G.; BRUNS, R.E. The removal of the indigo carmine dye from aqueous solutions using cross-linked chitosan: Evaluation of adsorption thermodynamics using a full factorial design. **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, p. 566-574, 2008.

CHEN, P. Y.; LIN, A. Y. M., MCKITTRICK, J.; MEYERS, M. A. Structure and mechanical properties of crab exoskeletons. **Acta Biomater**, v. 4, p 587-596, 2008.

CIE. **Colorimetry**. 2 ed. Wien: Commission International de l'Éclairage, 1986.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test**. 13 ed. Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute, 2018. 92 p.

DUN, Y.; LI, Y.; XU, J.; HU, Y.; ZHANG, C.; LIANG, Y.; ZHAO, S. Simultaneous fermentation and hydrolysis to extract chitin from crayfish shell waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 420-426, 2019.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. Meeting the sustainable development goals**.. Rome: [s.n], 2018. 277 p.

ELSABEE, M. Z.; ABDU, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering**, v. 33, n. 4, p. 1819-1841, 2013.

ESCÁRCEGA-GALAZ, A. A.; SÁNCHEZ-MACHADO, D. I.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; SANCHEZ-SILVA, A.; MADERA-SANTARA, T. J.; PASEIRO-LOSADA, P. Characterization data of chitosan-based films: Antimicrobial activity, thermal analysis, elementary composition, tensile strength and degree crystallinity. **Data in Brief**, v. 21, p. 473-479, 2018.

FELIPE, L. O.; RABELLO, L. A.; JUNIOR, E. N.; SANTOS, I. J. Quitosana: da química básica à bioengenharia. **Química Nova Escolar**, v. 39, n. 4, p. 312-320, 2017.

GOMES, L. P.; OLIVEIRA, C. I. R.; SILVA, M. C.; ANDRADE, C. T.; AGUILA, E. M.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. Purificação e caracterização da quitinase de uva (*Vitis vinífera* L. CV RED GLOBE) para a produção de quitosana a partir de quitina de camarão. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1882-1886, 2010.

GORTARI, M. C.; HOURS, R. A. Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: A mini-review. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 1-14, 2013.

GOY, R. C.; MORAIS, S. T. B.; ASSIS, O. B. G.; DUARTE, L. M. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n.1, p. 122-127, 2016.

HALABALOVA, V.; SIMEK, L. MOKREJS, P. Intrinsic viscosity and conformational parameters of chitosan chains. **Rasayan Journal of Chemistry**, v. 4, p. 223-241, 2011.

HAMED, I.; ÖZOGUL, F.; REGENSTEIN, J. M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan and chitooligosaccharides): A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 40-50, 2016.

HOLANDA, H. D.; NETTO, F. M. Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, p. 298-303, 2006.

KASAAI, M. Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 801-810, 2010.

KAUR, S.; DHILLON, G. S. Recent trends in biological extraction of chitin from marine shell wastes: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 44-61, 2015.

KIMURA, V. T.; MIYASATO, C. S.; GENESI, B. P.; LOPES, P. S.; YOSHIDA, C. M. P.; SILVA, C. F. The effect of andiroba oil and chitosan concentration on the physical properties of chitosan emulsion film. **Polímeros**, v. 26, n. 2, p. 168-174, 2016.

KITTUR, F. S.; PRASHANTH, H.; SANKAR, K. U.; THARANATHAN, R. N. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 2, p. 185-193, 2002.

KNIDRI, H. E.; BELAABED, R.; ADDAOU, A.; LAAJEB, A.; LAHSINI, A. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1191-1189, 2018.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 43-81, 2000.

KUMAR B.; SMITA K., CUMBAL L.; DEBUT A. Synthesis of silver nanoparticles using sacha inchi (*Plukenetia volubilis L.*) leaf extracts. **Saudi Journal of Biological Science**, v. 21, p. 605-609, 2014.

KUMIRSKA, J.; CZERWICKA, M.; KACZYNSKI, Z.; BYCHOWSKA, A.; BRZOZOWSKI, K.; THOMING, J.; STEPNOWSKI, P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. **Marine Drugs**, v. 8, n. 5, 2010.

LAGE-YUSTY, M.; VILASOA-MARTÍNEZ, M.; ÁLVAREZ-PÉREZ, S.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J. Chemical composition of snow crab shells (*Chionoecetes opilio*). **CyTA - Journal of Food**, v. 9, n. 4, p. 265-270, 2011.

LATORRES, J. M.; RIOS, D. G.; SAGGIOMO, G.; WASIELESKY, W. Jr.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Functional and antioxidant properties of protein hydrolysates obtained from White shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 721-729, 2018.

LOPES, C.; ANTELO, L. T.; FRANCO-URÍA, A.; ALONSO, A. A.; PÉREZ-MARTÍN, R. Chitin production from crustacean biomass: Sustainability assessment of chemical and enzymatic processes. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 4140-4151, 2018.

MAO, X.; ZHANG, J.; KAN, F.; GAO, Y.; LAN, J.; ZHANG, X.; HU, Z.; LI, Y.; LIN, H. Antioxidant production and chitin recovery from shrimp head fermentation with *Streptococcus thermophilus*. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 1023-1032, 2013.

MORAN, H. B. T.; TURLEY, J. L., ANDERSSON, M., LAVELLE, E. C. Immunomodulatory properties of chitosan polymers. **Biomaterials**, v. 184, p. 1-19, 2018.

MORGANTI, P.; MORGANTI, G.; MORGANTI, A. Transforming nanostructured chitin from crustacean waste into beneficial health products: a must for our society. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 4, p. 123-127, 2011.

MOURA, C.; MUSZINSKI, P.; SCHMIDT, C.; ALMEIDA, J.; PINTO, L. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: Avaliação do processo em escala piloto. **Vetor**, v. 16, n. 1-2, p. 37-45, 2006.

MOURA, J. M.; FARIAS, B. S.; RODRIGUES, D. A. S.; MOURA, C. M.; DOTTO, G. L.; PINTO, L. A. A. Preparation of chitosan with different characteristics and its application for biofilms production. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 23, p. 470-477, 2015.

- MOUSAVI KHANEGHAH, A.; HASHEMI, S. M. B.; LIMBO, S. Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. **Food and Bioproducts Processing**, v. 111, p. 1-19, 2018.
- MOUSSOUT, H.; AHLAFI, H.; AAZZA, M.; BOURAKHOUDAR, M. Kinetic and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis. **Polymer Degradation and Stability**, v. 130, p. 1-9, 2016.
- MURAKAMI, K; AOKI, H.; NAKAMURA, S.; NAKAMURA, S.; TAKIKAWA, M.; HANZAWA, M.; KISHIMOTO, S.; HATTORI, H.; TANAKA, Y.; KIYOSAWA, T.; SATO, Y.; ISHIHARA, M. Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. **Biomaterials**, v. 31, p. 83-90, 2010.
- ÖZOGUL, F.; HAMED, I.; ÖZOGUL, Y.; REGENSTEIN, J. M. Crustacean by-products. **Reference Module in Food Science**, v. 10, p. 1-7, 2018.
- PACHECO, N.; GARNICA-GONZÁLEZ, M.; GIMENO, M.; BÁRZANA, E.; TROMBOTTO, S.; DAVID, L; SHIRAI, K. Structural characterization of chitin and chitosan obtained by biological and chemical methods. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 9, p. 3285-3290, 2011.
- PALERMO, E. F.; KURODA, K. Structural determinants of antimicrobial activity in polymers which mimic host defense peptides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 1605-1615, 2010.
- PIRES, C.; MARQUES, A.; CARVALHO, M. L.; BATISTA, I. Chemical characterization of *Cancer pagurus*, *Maja squinado*, *Necora puber* and *Carcinus maenas* shells. **Poultry, Fisheries & Wildlife Sciences**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2017.
- POSHINA, D. N.; RAIK, S. V.; POSHIN, A. N.; SKORIK, Y. A. Accessibility of chitin and chitosan in enzymatic hydrolysis: A review. **Polymer Degradation and Stability**, v. 156, p. 269-278, 2018.
- PRABU, K.; NATARAJAN, E. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of chitosan isolated from *Podophthalmus vigil*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 9, p. 75-82, 2012.
- QUEIROZ, M. F.; MELO, K. R. T.; SABRY, D. A.; SASSAKI, G. L.; ROCHA, H. A. O. Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation? **Marine Drugs**, v. 13, p. 141-158, 2015.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and application. **Progress Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.
- ROY, J. C.; SALAUN, F.; GIRAUD, S.; FERRI, A.; CHEN, G.; GUAN, J. Solubility of chitin: Solvents, solution behaviors and their related mechanisms. **Solubility Polysaccharides**, v. 10, p. 109-127, 2017.

SAGHEER, F. A. A.; AL-SUGHAYER, M. A.; MUSLIM, S.; ELSABEE, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 410-419, 2009.

SAYARI, N.; SILA, A.; ABDELMALEK, B. E.; ABDALLAH, R. B.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; BOUGATEF, A.; BALTI, R. Chitin and chitosan from the Norway lobster by-products: Antimicrobial and anti-proliferative activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 163-171, 2016.

SEDAGHATI, M.; EZZATPANAH, H.; BOOJAR, M. M. A.; EBRAHIMI, M. T.; KOBARFARD, F. Isolation and identification of some antibacterial peptides in the plasmin-digest of beta-casein. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 217-225, 2016.

SIGNINI, R.; CAMPANA-FILHO, S. P. On the preparation and characterization of chitosan hydrochloride. **Polymer Bulletin**, v. 42, n. 2, p. 159-166, 1998.

SILALAH, J.; SITUMORANG, P.; PATILAYA, P.; SILALAH, Y. C. Antibacterial activity of chitosan and hydrolyzed coconut oil and their combination against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 9, n. 5, 2016.

SIVASHANKARI, P. R.; PRABAHARAN, M. Deacetylation modification techniques of chitin and chitosan. **Chitosan Based Biomaterials**, v. 1, p. 117-133, 2017.

SUGJYANTI, D.; DARMADJI, P.; SANTOSO, U.; PRANOTO, Y.; ANWAR, C.; ANGGRAHINI, S. Biological activity of native and low molecular weight chitosan obtained by Steam Explosion Process. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 9, p. 441-447, 2018.

SZYMÁŃSKA, E.; WINNICKA, K. Stability of chitosan - A challenge for pharmaceutical and biomedical applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p. 1819-1846, 2015.

TOAN, N. V.; HANH, T. T. Application of chitosan solutions for rice production in Vietnam. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 382-384, 2013.

VALDEZ-PEÑA, A. U.; ESPINOZA-PÉREZ, J. D.; SANDOVAL-FABIAN, G. C.; BALAGURUSAMY, N.; HERNÁNDEZ-RIVERA, A.; DE-LA GARZA-RODRÍGUEZ, I. M.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C. Screening of industrial enzymes for deproteinization of shrimp head for chitin recovery. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 553-557, 2010.

VAN DYKEN, S. J.; LOCKSLEY, R. M. Chitins and chitinase activity in airway diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 142, n. 2, p. 364-369, 2018.

VÁZQUEZ, J. A.; NORIEGA, D.; RAMOS, P.; VALCARCEL, J.; NOVOA-CARBALLAL, R.; PASTRAN, L.; REIS, R. L.; PÉREZ-MARTÍN, R. I. Optimization of high purity chitin and chitosan production from *Illex argentinus* pens by a combination of enzymatic and chemical processes. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 262-272, 2017.

- VILLAMIL, O.; VÁQUIRO, H.; SOLANILLA, J. F. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and biactive properties. **Food Chemistry**, v. 224, p. 160-171, 2017.
- VINSOVA, J.; VAVRIKOVA, E. Recent advances in drugs and prodrugs design of chitosan. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 13, p. 1311-1326, 2008.
- YAN, N.; CHEN, X. Don't waste seafood waste. **Nature**, v. 524, p. 155-157, 2015.
- YEN, M.; YANG, J.; MAU, J. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 15-21, 2009.
- YOUNES, I.; GHORBEL-BELLAJ, O.; NASRI, R.; CHAABOUNI, M.; RINAUDO, M.; NASRI, M. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2032-2039, 2012.
- YOUNES, I.; HAJJI, S.; FRACHET, V.; RINAUDO, M.; JELLOULI, K.; NASRI, M. Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 489-498, 2014.
- YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133-1174, 2015.
- ZHANG, H.; NEAU, S. H. *In vitro* degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: Effect of molecular weight and degree of deacetylation. **Biomaterials**, v. 22, p. 1653-1658, 2001.
- ZHANG, H.; JIN, Y.; DENG, Y.; WANG, D.; ZHAO, Y. Production of chitin from shrimp shell powders using *Serratia marcescens* B742 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 successive two-step fermentation. **Carbohydrate Research**, v. 362, p. 13-20, 2012.
- ZHANG, H.; YUN, S.; SONG, L.; ZHANG, Y.; ZHAO, Y. The preparation and characterization of chitin and chitosan under large-scale submerged fermentation level using shrimp by-products as substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 334-339, 2017.
- ZOHURIAAN, M. J.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing**, v. 23, p. 575-579, 2004.



ARTIGO II  
EFEITO DE FILMES BIOATIVOS À BASE DE QUITOSANA NA CONSERVAÇÃO DE  
FILÉS DE PEITO DE FRANGO



## RESUMO

A carne de frango é altamente perecível durante o armazenamento sob refrigeração devido à rápida multiplicação dos micro-organismos. Em vista disso, algumas estratégias, como o uso de filmes bioativos, vêm sendo propostos com o objetivo de prolongar a vida útil, inibindo ou retardando a deterioração e a multiplicação de micro-organismos. O objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento, caracterização e aplicação de filmes à base de quitosana, produzida por processo misto a partir de subprodutos industriais do caranguejo vermelho, na conservação de filés de peito de frango, do tipo *Sassami*, armazenados a 4 °C durante 10 dias, visando verificar se há potencial para prolongar a vida útil, reduzindo a deterioração deste alimento em vista o efeito antimicrobiano. Para tanto, a quitosana foi produzida a partir da desacetilação química da quitina obtida de subprodutos industriais do caranguejo vermelho por processos biotecnológicos. Então foram desenvolvidos filmes, pelo método de *casting*, nas concentrações 1, 1,5 e 2% (m/v) e caracterizados quanto à atividade antimicrobiana, pelo método disco-difusão frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157:H7, propriedades físico-químicas, mecânicas, de barreira e morfológicas. Os filmes na concentração com maior potencial antimicrobiano e melhores propriedades mecânicas foram avaliados quanto ao uso como embalagens para os filés do tipo *Sassami*. Foram estudadas as seguintes condições de embalagem: filme de polietileno (P), filme de quitosana (Q), filme de quitosana e vácuo (QV) e filme de polietileno e vácuo (PV), sendo os filés avaliados quanto ao pH, cor, perda de massa, textura, estabilidade lipídica e análises microbiológicas (mesófilos aeróbios totais, enterobactérias, bactérias lácticas, psicrotróficos e *Pseudomonas* spp.). Dentre os principais resultados deste trabalho destaca-se o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da espessura, solubilidade, capacidade de retenção de água e coloração mais amarelada conforme o aumento da concentração de polímero. Estruturalmente, de modo geral, os filmes apresentaram-se homogêneos e uniformes, exceto para os filmes na concentração 1,5% (m/v) que apresentaram descontinuidades na matriz dos filmes. Os filmes contendo 2% (m/v) de quitosana apresentaram resistência a tração e alongação até ruptura de 19,79 MPa e 22,58%, superior ao verificado para as demais concentrações testadas. Além disso, apresentaram atividade antimicrobiana frente ao micro-organismo *Staphylococcus aureus* (5,2 mm), sendo escolhidos como melhor tratamento para a aplicação como revestimento ativo. Entretanto, para eles foi verificada a maior permeabilidade ao vapor de água (PVA) ( $6,31 \times 10^{-8}$  g mm/dia Pa cm<sup>2</sup>). Em relação aos filés de peito de frango, quando revestidos com os filmes de quitosana, apresentaram a inibição do grupo de micro-organismos avaliado, além de retardarem a oxidação lipídica. Porém, devido à elevada capacidade de retenção de água e maior PVA, os filmes elaborados somente com quitosana (Q), comprometeram a cor e a textura dos filés. Todavia, os filmes de quitosana mostram-se uma alternativa interessante como embalagem ativa retardando a deterioração dos alimentos.

Palavras-chave: Quitosana. Biopolímero. Atividade antimicrobiana. Filmes bioativos. Conservação.



## 1 INTRODUÇÃO

O consumo de carne de frango tem aumentado nas últimas décadas devido ao custo relativamente baixo e por ser um alimento fonte de proteína (aminoácidos essenciais), minerais, vitaminas e baixo teor de lipídios. Entretanto, essa composição torna a carne de frango um excelente substrato para a deterioração microbiana e reações oxidativas (RAEISI et al., 2016). Atualmente, pesquisadores e indústrias de processamento estão buscando o desenvolvimento de novas técnicas para reduzir o crescimento microbiano e a oxidação lipídica da carne, a fim de prolongar sua vida útil e preservar sua qualidade original (BAZARGANI-GILANI et al., 2015). A curta vida útil da carne de frango (aproximadamente 5 a 7 dias) revela a necessidade de usar novos métodos de preservação (LATOUE et al., 2014). Os filmes bioativos, com atividades antimicrobiana e antioxidante, são uma abordagem para controlar a multiplicação microbiana e a oxidação, melhorando a segurança dos alimentos cárneos, reduzindo os riscos de doenças transmitidas por alimentos, além das perdas financeiras aos produtores (UMARAW; VERMA, 2017).

Os polissacarídeos formam filmes com boas propriedades mecânicas e de barreira (MILKOVA; RADEVA, 2015). Dentre eles, os filmes à base de quitosana, um polissacarídeo catiônico com diversas propriedades biológicas importantes, tais como atividade antimicrobiana, antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória, têm atraído grande interesse. A quitosana é um polímero com aplicações em diversos campos (SZYMAŃSKA; WINNICKA, 2015). Contudo, em filmes e revestimentos comestíveis, a quitosana vem se destacando por apresentar propriedades tecnológicas e biológicas adequadas quando aplicada em alimentos, tais como biocompatibilidade, propriedades antimicrobianas e antioxidantes, permeabilidade seletiva de gases ( $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$ ), resistência e flexibilidade, aparência desejável e atoxicidade (ELSABEE; ABDOL, 2013).

A quitosana geralmente é produzida através da desacetilação química da quitina recuperada de subprodutos industriais de crustáceos (KNIDRI et al., 2018). Entretanto, dentro dessa aplicação de tecnologias mais limpas, ambientalmente corretas, processos biotecnológicos têm sido estudados para a produção deste biopolímero visando à preservação da estrutura polissacarídica, que confere as propriedades e funcionalidades, e a redução da quantidade de rejeitos tóxicos e poluentes gerados (DUN et al., 2019; HAMDY et al., 2018; LOPES et al., 2018; ZHANG et al., 2017). Em vista disso, objetivo do presente estudo foi estudar o desenvolvimento, caracterização e aplicação de filmes à base de quitosana, produzida por processo misto a partir de subprodutos industriais do caranguejo vermelho, na conservação

de filés de peito de frango, do tipo *Sassami*, armazenados a 4 °C durante 10 dias, visando verificar se há potencial para prolongar a vida útil, reduzindo a deterioração deste alimento em vista o efeito antimicrobiano.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAL**

#### **2.1.1 Matéria-prima**

A quitosana foi produzida no Laboratório de Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Rio Grande – FURG, a partir da quitina proveniente de subprodutos industriais do processamento do caranguejo vermelho (*Chaceon notialis*). Inicialmente, a quitina foi obtida através da desproteinização das carapaças de caranguejo secas e trituradas por hidrólise enzimática, seguida da desmineralização por fermentação láctica, conforme descrito respectivamente por Antunes-Valcareggi, Ferreira e Hense (2017), com modificações na proporção enzima/substrato proteico e temperatura de processo, e Zhang et al. (2017), com modificações na etapa de desproteinização, concentração de glicose e tempo de processo. A reação de desacetilação da quitina para a produção de quitosana foi realizada de acordo com Moura et al. (2015), utilizando solução alcalina concentrada (NaOH 40% m/v) à  $130 \pm 2$  °C, durante 90 min, sob agitação mecânica constante (50 rpm) em um reator de vidro encamisado acoplado de banho ultratermostático. A quitosana bruta foi purificada com ácido acético 1% (v/v) e hidróxido de sódio 8% (m/v), seguida da centrifugação para remoção das impurezas. A quitosana produzida apresentou grau de desacetilação de 80,17%, massa molar de 192 kDa e composição proximal de 7,9% de umidade, 1,3% de cinzas, 0,89 de proteínas e 0,02% de lipídios.

#### **2.1.2 Micro-organismos e reagentes**

Para a atividade antimicrobiana foram utilizados os micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 10832 e *Escherichia coli* O157:H7. Os reagentes utilizados no presente estudo foram de grau analítico (P.A.).

## 2.2 DESENVOLVIMENTO DOS FILMES

Os filmes à base de quitosana foram desenvolvidos pela técnica de *casting*, segundo método descrito por Priyadarshi e Negi (2017). A partir de testes preliminares (apêndice II) foram estudadas três concentrações de quitosana 1, 1,5 e 2% (m/v), para avaliar qual apresentaria melhores propriedades para aplicação como filmes bioativos na conservação de filés de frango. As soluções filmogênicas foram preparadas através da dissolução da quitosana, em 100 mL da solução de ácido acético 1% (v/v), e da adição de glicerol, como plastificante, na concentração de 30% (g de glicerol/100 g de quitosana), sob agitação contínua em agitador magnético (Fisatom, Brasil) durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, as soluções foram transferidas para um reator de vidro encamisado (Quimis, Q212S, Brasil) onde ficaram por 1 h sob agitação constante a 60 °C. Aproximadamente 0,010 g/cm<sup>2</sup> das soluções filmogênicas foram vertidas em placas de vidro com área de 225 cm<sup>2</sup>. Em seguida, os filmes foram secos em estufa (Quimis, Brasil) com circulação de ar a 35 °C durante 16 – 18 h. Os filmes foram acondicionados em dessecadores, contendo cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) a 50% de umidade relativa (UR) durante 24 h a 22 °C.

### 2.2.1 Caracterização dos filmes

#### 2.2.1.1 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada com micrômetro digital (Insize, IP54, Brasil, resolução 0,001 mm). A espessura foi determinada pela média aritmética de dez medidas aleatórias sobre a seção transversal dos filmes, sendo a determinação realizada em triplicata (POLA et al., 2016).

#### 2.2.1.2 Propriedades mecânicas

A resistência à tração – RT (MPa) e a alongação até a ruptura – ER (%) dos filmes foram determinadas segundo método descrito pela *American Society for Testing and Materials* – ASTM D882-12 (ASTM, 2012), utilizando texturômetro TA.XT<sub>2plus</sub> (Stable Micro Systems, Inglaterra). As amostras foram cortadas em forma de retângulos (85 x 25 mm) e fixadas em garras com separação inicial de 50 mm. A RT e a ER, foram mensuradas em 10 tiras de filme, sendo a determinação realizada em triplicata.

### 2.2.1.3 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA), foi determinada em triplicata segundo método descrito pela ASTM E96-00 (ASTM, 2000). O filme foi selado em célula de permeação contendo sílica seca (0% UR) e em seguida foi acondicionado em dessecadores com água destilada (100% UR) a 22 °C. As amostras foram pesadas a cada hora durante 7 h e a cada 24 h por 7 dias. A PVA foi determinada segundo a Equação 1:

$$\text{PVA (g mm/ h cm}^2 \text{ Pa.)} = \frac{W \times X}{t \times A \times \Delta P} \quad (1)$$

Onde W é o ganho de massa (g), X é a espessura do filme (mm), t é o tempo (h), A é a área do filme exposto (15,90 cm<sup>2</sup>), e ΔP é a diferença da pressão parcial entre a atmosfera e a sílica (2642 Pa a 22 °C). Os resultados foram expressos como g mm/ h cm<sup>2</sup> Pa.

### 2.2.1.4 Solubilidade em água e intumescimento

A solubilidade em água foi determinada em triplicata, segundo método descrito por Pastor et al. (2013). Os filmes foram cortados em quadrados (2 x 2 cm<sup>2</sup>), secos em estufa (Fanem 520, Brasil) a 105 °C durante 24 h, esses foram colocados em frascos de polietileno contendo 50 mL de água destilada e mantidos a 25 °C e 175 rpm durante 24 h. Em seguida, procedeu-se à filtração em papel filtro para recuperar o restante do filme não dissolvido, o qual foi seco a 105 °C durante 24 h. A solubilidade em água foi calculada segundo a Equação 2:

$$S(\%) = \left( \frac{W_0 - W_f}{W_0} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde W<sub>0</sub> é a massa inicial do filme expressa em massa seca (g) e W<sub>f</sub> é a massa final do filme não dissolvido. Os resultados foram expressos em %.

O intumescimento em água foi determinado em triplicata, segundo método descrito por Assis (2010). Os filmes à base de quitosana foram cortados com aproximadamente 1,0 cm<sup>2</sup> e, em seguida, secos em estufa (Fanem 520, Brasil) a 105 °C durante 24 h. Logo em seguida, os

filmes foram pesados em balança analítica e imersos em recipientes contendo água. De 10 em 10 min durante 1 h os filmes eram removidos dos meios com auxílio de pinça e cuidadosamente enxugados com auxílio de papel filtro e novamente pesados. O intumescimento foi calculado segundo a equação 3:

$$I(\%) = \left( \frac{W_0 - W_f}{W_0} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde  $W_0$  é a massa inicial do filme expressa em massa seca (g) e  $W_f$  é a massa final do filme instumescido. Os resultados foram expressos em %.

#### 2.2.1.5 Cor, opacidade e transparência

A cor foi determinada em triplicata em colorímetro (Minolta, CR-400, Japão), utilizando o sistema de escala de cor da Comissão Internacional de Iluminação (CIE  $L^*a^*b^*$ ), segundo método descrito pela CIE Lab (CIE, 1986). Como padrão branco foi utilizada uma placa ( $L^* = 97,75$ ;  $a^* = -0,49$  e  $b^* = 1,94$ ). Foram determinadas as coordenadas desse sistema tridimensional: luminosidade ( $L^*$ ), que é acromática e varia de 0 (preto) a 100 (branco); e as coordenadas  $a^*$  e  $b^*$  onde  $a^*$ =coordenada do verde-vermelho ( $-a^*$ : verde,  $+a^*$ : vermelho); e  $b^*$ =coordenada azul-amarelo ( $-b^*$ :azul,  $+b^*$ :amarelo).

A opacidade (Y) foi determinada em triplicata em colorímetro (Minolta, CR-400, Japão), segundo método descrito por Sobral (2000). A Y foi determinada segundo a Equação 4:

$$Y (\%) = \left( \frac{Y_p}{Y_b} \right) \times 100 \quad (4)$$

Onde  $Y_p$  é a opacidade do filme sobreposto sobre o padrão preto;  $Y_b$  é a opacidade do filme sobreposto sobre o padrão branco multiplicada por 100 e expressa em %.

A transparência foi avaliada em triplicata em espectrofotômetro (Bioespectro, SP22, São Paulo) a 600 nm, segundo método descrito por Souza et al. (2017). A transparência dos filmes foi determinada segundo a Equação 5:

$$\text{Transparência} = \frac{\text{Abs } 600}{x} \quad (5)$$

Onde Abs 600 é a absorbância mensurada a 600 nm; x é a espessura do filme em mm.

#### 2.2.1.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-Sul), da Universidade Federal do Rio Grande, em microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM - 6610LV, Tóquio, Japão) operando a 10 kV. As amostras foram depositadas em suportes de alumínio (*stubs*), revestidos com uma fita condutora de carbono. Em seguida, os mesmos foram recobertos com uma camada de ouro em *Sputtering* (Desk, Denton Vacuum, Estados Unidos) durante 120 s. A morfologia das amostras foi observada em 1000 x de ampliação.

#### 2.2.1.7 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A calorimetria dos filmes foi determinada segundo Cestari et al. (2008) em calorímetro diferencial de varredura (Shimadzu, TA-60WS, Japão). Os filmes foram pesados, aproximadamente 3 mg, em cápsulas de alumínio e as cápsulas seladas hermeticamente. A varredura de temperatura foi realizada com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min em um intervalo de temperatura de 25 a 500 °C. Foram determinadas as temperaturas de fusão ( $T_f$ ) e as temperaturas de decomposição ( $T_d$ ), bem como as energias térmicas ( $\Delta H$ ) necessárias para cada transição a partir das áreas dos picos.

#### 2.2.1.8 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica dos filmes foi realizada segundo método descrito por Kumar et al. (2014) em termobalança (Shimadzu, DTG 60, Japão). Os filmes foram pesados (aproximadamente 3 mg) e aquecidos a uma taxa de 25°C/min em um intervalo de temperatura de 20 a 500 °C, sob atmosfera de nitrogênio a uma taxa de fluxo de 50 mL/min. A perda de massa foi expressa em porcentagem.

## 2.3 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE

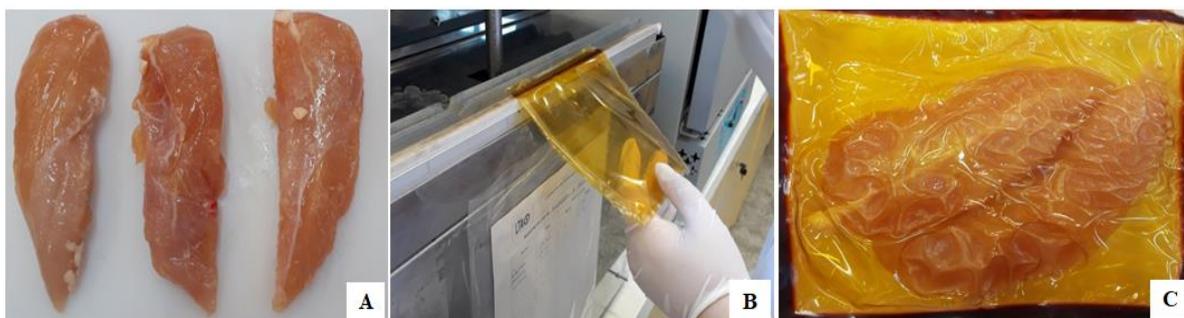
### 2.3.1 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi medida pelo método do teste disco-difusão, de acordo com o método descrito pela CLSI (2018). A zona de inibição, em meio sólido, foi utilizada para determinar o efeito antimicrobiano dos filmes de quitosana frente a *Escherichia coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832). A análise foi realizada em placas de Petri descartáveis contendo o ágar *Brain Heart Infusion* (BHI), onde foram inoculados 100 µL das suspensões microbianas e espalhados com alça de Drigalski estéril, com base na turvação equivalente ao padrão de 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL. Posteriormente, foram adicionados no ágar inoculado os filmes com 5 mm de diâmetro, com auxílio de uma pinça estéril. As placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C (Estufa Nova Ética, Brasil). Após a incubação, o diâmetro da zona de inibição (halo) foi mensurado com auxílio de um paquímetro em quadruplicata e os resultados foram expressos em mm de inibição.

## 2.4 USO DE FILMES BIOATIVOS NA CONSERVAÇÃO DE FILÉS DE PEITO DE FRANGO

A Figura 1 apresenta o protótipo de embalagem desenvolvido com os filmes de quitosana. A embalagem foi desenvolvida para aplicação em carne de frango visando avaliar o efeito antimicrobiano desta na conservação do alimento.

**Figura 1-** Filés de frango revestidos pelos filmes à base de quitosana



A: Filés de peito de Frango (*Sassami*). B: Selagem dos filmes de quitosana. C: Filés de frango embalados com filmes de quitosana.

Os filés de peito de frango, resfriados e sem pele do tipo *Sassami*, foram adquiridos do mesmo lote no comércio local da cidade de Rio Grande e transferidos imediatamente para o Laboratório de Tecnologia de Alimentos – LTA (FURG) em caixas térmicas com gelo. Todos filés foram misturados, para obter uma amostragem, e posteriormente separados em porções de aproximadamente 125 g, assim obteve-se uma embalagem para cada tempo contendo dois filés. Estes foram revestidos com os filmes dos seguintes tratamentos: P – Filme de polietileno, Q – Filme de quitosana (2% m/v), QV – Filme de quitosana (2% m/v) e vácuo e PV – Filme de polietileno e vácuo. Em seguida, os mesmos foram dispostos em bandejas de isopor e armazenados em incubadora BOD a  $4 \pm 1$  °C durante 10 dias.

#### **2.4.1 Avaliações nos filés de peito de frango**

Os filés foram avaliados periodicamente (zero, 3, 5, 7 e 10 dias) quanto ao perda de massa, força de cisalhamento (parâmetro de textura), pH, core análises microbiológicas. Para tanto, os filmes foram removidos assepticamente das amostras de filé de frango, com auxílio de pinças estéreis.

##### **2.4.1.1 Perda de massa**

A perda de massa foi determinada gravimetricamente em triplicata, segundo método descrito por Gómez-Estaca et al. (2010) onde foi relacionada a diferença entre a massa inicial e a massa final dos filés embalados, obtida para cada tempo de armazenamento. A perda de massa foi expressa como g/100 g (%).

##### **2.4.1.2 Força de cisalhamento**

A maciez e resistência ao corte, relacionadas à textura dos filés de peito de frango, foi determinada através da avaliação da força de cisalhamento utilizando um texturômetro modelo TA-XT<sub>2</sub>plus (Stable Micro Systems, Reino Unido) calibrado para velocidade de corte de 2 mm/s, velocidade de retorno de 5 mm/s, sensibilidade de 0.250 N e unidades kgf. Os filés foram submetidos ao corte utilizando lâmina de cisalhamento Warner-Bratzler (kgf), sendo os resultados expressos em kgf e a avaliação determinada em triplicata, conforme descrito por Cortez-Vega, Pizato e Prentice (2012).

#### 2.4.1.3 pH

O pH dos filés foi determinado em triplicata, segundo método descrito por Gómez-Estaca et al. (2010). Aproximadamente, 10 g de filé foram homogeneizados em água destilada na proporção 1:2 (m/v). Após 5 min à temperatura ambiente, o pH foi determinado em pHmetro (Qumis, Q400AS, Brasil).

#### 2.4.1.4 Cor

A cor dos filés foi determinada em triplicata em colorímetro (Minolta, CR-400, Japão), utilizando o sistema de escala de cor da Comissão Internacional de Iluminação (CIE  $L^*a^*b^*$ ), segundo método descrito pela CIE Lab (CIE, 1986). Como padrão branco foi utilizada uma placa ( $L^* = 97,75$ ;  $a^* = -0,49$  e  $b^* = 1,94$ ). Foram determinadas as coordenadas desse sistema tridimensional: luminosidade ( $L^*$ ), que é acromática e varia de 0 (preto) a 100 (branco); e as coordenadas  $a^*$  e  $b^*$  onde  $a^*$ =coordenada do verde-vermelho ( $-a^*$ : verde,  $+a^*$ : vermelho); e  $b^*$ =coordenada azul-amarelo ( $-b^*$ : azul,  $+b^*$ : amarelo).

#### 2.4.1.5 Estabilidade lipídica (TBARS)

A estabilidade lipídica dos filés foi determinada pelo ensaio de TBARS segundo método descrito por Crackel et al. (1998). As amostras de filé (10 g) foram homogeneizadas em 25 mL de ácido tricloroacético (7,5% p/v) com auxílio de mixer (Philips Walita, RI 1600) e após foram submetidas a centrifugação a 9000 x g durante 5 min em centrífuga (Biosystems, MPW 350). Do sobrenadante foram retirados 5 mL e adicionados 5 mL da solução de TBA (0,02 M), e homogeneizada em agitador de tubos (Vortex, Vx-38) durante 30 s. Posteriormente, a solução foi submetida a banho-maria (Quimis, Q214M2) a 80 °C durante 30 min. Após o arrefecimento, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS (Kasuki, IL 592) a 538 nm. Então, uma curva padrão de Tetraetoxipropano (TEP) foi plotada na quantificação do TBARS.

#### 2.4.1.6 Análises microbiológicas

O efeito antimicrobiano dos diferentes revestimentos durante o armazenamento foi avaliado em triplicata, segundo métodos descritos por Arancibia et al. (2015). Os filmes foram

removidos assepticamente dos filés de peito de frango (*Sassami*) que foram pesados (aproximadamente  $25 \pm 0,2$  g) e transferidos para Stomacher (ITR, MR 1204, Brasil) com 225 mL de água peptonada estéril 0,1% (m/v) (Himedia, Índia), sendo homogeneizados durante 1 min a temperatura ambiente. Em seguida, foram preparadas diluições apropriadas para as seguintes determinações microbiológicas: (i) mesófilos aeróbios totais em Ágar Padrão para Contagem – PCA (Kasvi, Itália), em profundidade, através da incubação a 30 °C durante 72 h; (ii) *Pseudomonas* spp. em Ágar Isolamento de *Pseudomonas* (Difco, França), em superfície, incubados a 25 °C durante 48 h; (iii iv) enterobactérias, em camada dupla de Ágar Bile Vermelho Violeta Glicose – BVVG (Kasvi, Itália), incubados a 30 °C durante 48 h; (iv) bactérias ácido lácticas, em camada dupla de Ágar *Lactobacillus* – MRS (Kasvi, Itália) incubados a 30 °C durante 72 h e (v) psicotróficos em Ágar Padrão para Contagem – PCA (Kasvi, Itália), em superfície, incubados a 4 °C durante 7 dias. A contagem microbiológica foi expressa em log de unidades formadoras de colônias por grama de amostra (Log UFC/g).

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de espessura, resistência a tração, alongação até a ruptura, permeabilidade ao vapor de água, solubilidade e intumescimento, cor, opacidade e transparência, pH, perda de massa, textura, estabilidade lipídica e análise microbiológica foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Os dados foram avaliados pelo software Statistica (versão 5.0, StatSoft, Inc., Tulsa, Estados Unidos).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

Os efeitos das concentrações de quitosana utilizadas sobre as propriedades dos filmes são apresentados na Tabela 1. Com base nos dados, pode-se observar que as propriedades dos filmes de quitosana, de modo geral, foram influenciadas diretamente com o aumento da concentração do polímero. Assim, foi possível notar que os filmes são flexíveis, porém também são fortes e difíceis de rasgar, especialmente na maior concentração (2% m/v), sendo suas propriedades mecânicas comparadas aos polímeros sintéticos de força média. Entretanto, esses

filmes são sensíveis à umidade, o que pode limitar sua aplicação em alguns alimentos (FERREIRA et al., 2014).

**Tabela 1** - Propriedades dos filmes à base de quitosana em diferentes concentrações

Propriedades	F1	F1.5	F2
Espessura (mm)	0,073 <sup>c</sup> ± 0,001	0,087 <sup>b</sup> ± 0,001	0,098 <sup>a</sup> ± 0,002
RT (MPa)	10,80 <sup>c</sup> ± 1,78	19,79 <sup>a</sup> ± 1,55	19,97 <sup>b</sup> ± 1,23
ER (%)	19,02 <sup>b</sup> ± 0,41	6,83 <sup>c</sup> ± 0,15	22,58 <sup>a</sup> ± 0,61
PVA (x10 <sup>-8</sup> ) (g mm/dia Pa cm <sup>2</sup> )	5,34 <sup>c</sup> ± 0,73	5,62 <sup>b</sup> ± 0,77	6,31 <sup>a</sup> ± 0,71
Solubilidade (%)	35,95 <sup>c</sup> ± 0,86	38,65 <sup>b</sup> ± 0,31	40,32 <sup>a</sup> ± 0,34
Intumescimento (%)	150,52 <sup>c</sup> ± 0,69	222,70 <sup>b</sup> ± 4,87	258,77 <sup>a</sup> ± 5,50
<i>L</i> *	92,89 <sup>a</sup> ± 0,14	89,07 <sup>b</sup> ± 0,13	87,10 <sup>c</sup> ± 0,20
<i>a</i> *	- 4,17 <sup>b</sup> ± 0,04	- 6,39 <sup>a</sup> ± 0,02	- 3,99 <sup>c</sup> ± 0,07
<i>b</i> *	22,20 <sup>c</sup> ± 0,20	61,37 <sup>b</sup> ± 0,16	78,06 <sup>a</sup> ± 0,21
Y (%)	7,85 <sup>b</sup> ± 0,16	8,11 <sup>ab</sup> ± 0,14	8,51 <sup>a</sup> ± 0,17
Transparência	1,57 <sup>a</sup> ± 0,06	1,16 <sup>b</sup> ± 0,02	1,06 <sup>c</sup> ± 0,05

F1: Filmes de quitosana na concentração 1% (m/v). F1,5: Filmes de quitosana na concentração 1.5% (m/v). F2: Filmes de quitosana na concentração 2% (m/v). RT: Resistência à tração. ER: Elongação até a ruptura. PVA: Permeabilidade ao vapor de água. *L*\*: luminosidade, varia de 0 (preto) a 100 (branco). *a*\*: coordenada do verde-vermelho (-*a*\*: verde, +*a*\*: vermelho). *b*\*: coordenada azul-amarelo (-*b*\*: azul, +*b*\*: amarelo). Y: opacidade. Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

A Figura 2 apresenta os filmes à base de quitosana nas concentrações 1 (F1), 1,5 (F1.5) e 2% (F2) (m/v). Os filmes apresentaram-se, de modo geral, homogêneos, flexíveis e com a coloração mais amarela com o aumento da concentração de quitosana. Entretanto, nas extremidades dos filmes F1.5 foi possível observar descontinuidades na interação polímero-plastificante, o que pode afetar as propriedades mecânicas e de barreira dos mesmos. Priyadarshi et al. (2018) estudaram filmes de quitosana incorporados com ácido cítrico e observaram comportamento similar ao deste estudo, em relação a áreas de heterogeneidade nos filmes, em função da separação do glicerol utilizado como plastificante.

**Figura 2** – Filmes à base de quitosana nas concentrações (A) 1, (B) 1,5 e (C) 2% (m/v)



Segundo Homez-Jara et al. (2018), a concentração de quitosana e a temperatura de secagem dos filmes tem influência direta na interação da cadeia polimérica com o plastificante escolhido e a coloração dos filmes. A cor amarela é uma característica dos filmes de quitosana, associada à presença das unidades  $\beta$ -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose, que sofrem reações de escurecimento em virtude das temperaturas de secagem empregadas e a concentração de quitosana utilizada.

### 3.1.1 Espessura e propriedades mecânicas (RT e ER)

A espessura dos filmes aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) dos filmes F1 (0,073 mm) para F2 (0,098). Segundo Han e Krochta (1999), a espessura do filme é influenciada pelo conteúdo de sólidos da solução filmogênica, a qual no presente estudo foi a mesma para todos os filmes elaborados. Entretanto, de acordo com Homez-Jara et al. (2018), as diferenças nas espessuras dos filmes de quitosana podem ser atribuídas à presença de pequenas partículas sólidas na superfície dos filmes, como impurezas ou a quitosana não solubilizada. Assim, foi possível observar que os filmes na maior concentração (F2) apresentaram maior espessura, possivelmente devido ao mesmo comportamento descrito pelos autores, visto que visualmente foi verificado a presença de pequenas partículas mesmo após a filtração das soluções filmogênicas.

A aplicação de uma embalagem depende diretamente das suas propriedades mecânicas e de barreira, para preservar a integridade dos alimentos durante o manuseio, transporte e armazenamento (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2005). A resistência à tração (RT) e a alongação até a ruptura (ER) dos filmes também apresentaram, de modo geral, um aumento

significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao aumento da concentração de quitosana nos filmes, exceto para os filmes F1.5 onde houve uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) na ER.

A RT aumentou de 10,80 para 19,79 e 19,97 MPa, para os filmes F1, F1.5 e F2, respectivamente. Priyadarshi et al. (2018) avaliando os filmes de quitosana incorporados com ácido cítrico encontraram RT de 9,48 MPa, resultado inferior ao deste estudo. Comportamento próximo foi observado por Pereda et al. (2011), em filmes de quitosana na concentração 2% (m/v), encontrando RT de 17,3 MPa. Segundo Rivero et al. (2009), existe uma grande dispersão nos dados de resistência à tração reportados na literatura, para filmes de quitosana, visto que esta propriedade é dependente das diferentes composições do biopolímero, graus de desacetilação, massas molares, solubilização e métodos de elaboração dos filmes.

A ER aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) dos filmes F1 (19,02%) para F2 (22,58%), com exceção de F1.5 (6,83%). A adição do plastificante (glicerol) diminui as forças intermoleculares na cadeia polimérica, o que aumenta a flexibilidade do filme, resultando em um aumento na elongação até a ruptura (SU et al., 2010). Entretanto, o mesmo comportamento não foi verificado nos filmes F1.5, os quais apresentaram um decréscimo significativo ( $p < 0,05$ ) na ER. Conforme observado na Figura 2, esses filmes apresentaram descontinuidades na interação polímero-plastificante, com o glicerol separando-se nas extremidades dos filmes. Segundo Priyadarshi e Negi (2017), a formação de ligações de hidrogênio aumenta a coesão entre a cadeia polimérica e o plastificante que impede a sua separação. Quando essas ligações são fracas, geralmente devido a condições empregadas na produção dos filmes, a interação do polímero com o plastificante é reduzida, ocasionando uma diminuição na flexibilidade e menor elongação. Resultados próximos ao deste estudo foram verificados por Alvarado et al. (2015) quando avaliaram filmes de quitosana utilizando glicerol como plastificante (20,2%). Diferentemente de Escárcega-Galaz et al. (2018), que observaram ER maior (32,65%) para filmes de quitosana na concentração 2% (m/v).

### **3.1.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)**

A Tabela 1 apresenta a permeabilidade ao vapor de água por dias (PVA) dos filmes elaborados à base de quitosana em diferentes concentrações. O aumento da concentração de quitosana de 1 para 2% (m/v) aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a PVA dos filmes. O comportamento de PVA pode ser explicado pela presença dos grupos hidrofílicos ( $-NH_2$  e  $-OH$ ) na quitosana, representando sítios de ligação para moléculas de água na cadeia de polimérica, favorecendo a transmissão de vapor de água nos filmes. Assim, quanto maior a

concentração do polímero, mais grupos estarão disponíveis para a interação, aumentando a PVA (MEI et al., 2013). Escárcega-Galaz et al. (2018) estudaram filmes de quitosana nas concentrações 1, 2 e 3% (m/v) e observaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na PVA dos filmes associado ao aumento da concentração do polímero, sendo este comportamento similar ao deste estudo. Em relação à avaliação da PVA ao longo do tempo, Aguirre-Loredo et al. (2016) e Pereda et al. (2014) relataram que as moléculas de água adsorvidas plastificam áreas amorfas da rede polimérica, resultando em uma estrutura mais flexível que favorece maior adsorção de água e maior PVA durante as primeiras horas. Entretanto, ocorrerá a diminuição gradual deste comportamento ao longo dos dias, devido à reticulação das regiões cristalinas, reduzindo a taxa de difusão e a PVA.

### 3.1.3 Solubilidade em água e intumescimento

A Tabela 1 apresenta o efeito das diferentes concentrações utilizadas nos filmes sobre a solubilidade em água e o intumescimento. O filme F2 apresentou solubilidade em água significativamente ( $p < 0,05$ ) superior (40,32%) em comparação com aos filmes F1 e F1.5 (35,95 e 38,65%). Hafsa et al. (2016) avaliando filmes de quitosana na concentração 2% (m/v) verificaram 30,92% de solubilidade dos filmes em água. Segundo os autores, fatores como o grau de desacetilação e a massa molar desempenham um papel importante na sua solubilidade, justificando as diferenças encontradas nos estudos. Segundo Cho et al. (2000), a medida que o grau de desacetilação aumenta, a solubilidade também aumenta, devido a disponibilidade dos grupos  $-NH_2$  protonados no polímero que facilitam a interação com moléculas de água. Priyadarshi et al. (2018) também encontraram comportamento similar ao deste estudo quando compararam filmes de quitosana contendo glicerol e ácido cítrico com filmes de quitosana sem plastificante. Os filmes de quitosana com plastificante (2% m/v), utilizando uma quitosana com grau de desacetilação de 75% (valor próximo ao deste estudo), tiveram a solubilidade aumentada (34,42%) em relação aos filmes de quitosana puro (23,91%).

O intumescimento refere-se à capacidade de um filme reter água em sua matriz. Sendo assim, foi possível observar que os filmes F2 apresentam intumescimento significativamente maior (258,77%) ( $p < 0,05$ ) em relação aos filmes F1 (150,52%) e F1.5 (222,70%). Isso pode estar relacionado à presença dos grupos hidrofílicos na estrutura do polímero, pois em maior concentração estão mais disponíveis, facilitando a interação com a água. Homez-Jara et al. (2018) estudaram filmes de quitosana obtidos com diferentes concentrações do polímero e diferentes temperaturas de secagem e verificaram que a

capacidade de retenção de água dos filmes variaram entre 113 e 236%. Segundo os autores, os filmes na maior concentração 1,5% (m/v) e secos a 40 °C apresentaram maior intumescimento (236%) devido às interações entre o polímero e o plastificante, de natureza hidrofílica, serem incrementadas no processamento em temperaturas mais elevadas. Desta forma, aumenta-se a mobilidade da matriz e a afinidade com moléculas de água, tornando-a mais suscetível ao intumescimento, conforme observado também no presente estudo.

### 3.1.4 Cor, opacidade e transparência

A Tabela 1 apresenta a mudança nos parâmetros de cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) e opacidade (Y) dos filmes elaborados. Os resultados obtidos indicaram que o filme F1 apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao parâmetro de luminosidade ( $L^*$ ) em relação aos filmes F1.5 e F2, apresentando maior tendência à coloração clara (92,89). Para o parâmetro  $b^*$ , os resultados indicaram uma tendência significativa ( $p < 0,05$ ) a cor amarela com o aumento da concentração, conforme pode ser visto na Figura 2, onde os filmes F2 apresentaram coloração mais intensa ( $b^* 78,06$ ). Os valores para o parâmetro  $a^*$  (verde-vermelho) variaram significativamente ( $p < 0,05$ ) entre -6,39 e -3,99 indicando que os filmes de quitosana mostram uma ligeira tendência para a coloração verde. Homez-Jara et al. (2018) verificaram comportamento similar ao deste estudo quando avaliaram filmes de quitosana nas concentrações 0,5, 1 e 1,5% (m/v) secos a 40 °C. Esses autores observaram que os valores para o parâmetro  $L^*$  diminuíram à medida que a concentração de quitosana aumentou, atribuindo esse comportamento a sinergia da interação polímero-plastificante e temperaturas mais elevadas de secagem que resultaram em um aumento no nível de compactação da cadeia polimérica, modificando e restringindo a passagem da luz através da matriz do filme. Além disso, no mesmo estudo, também foi possível verificar valores superiores de  $b^*$  com o aumento da concentração que conferiram coloração amarelada aos filmes de quitosana.

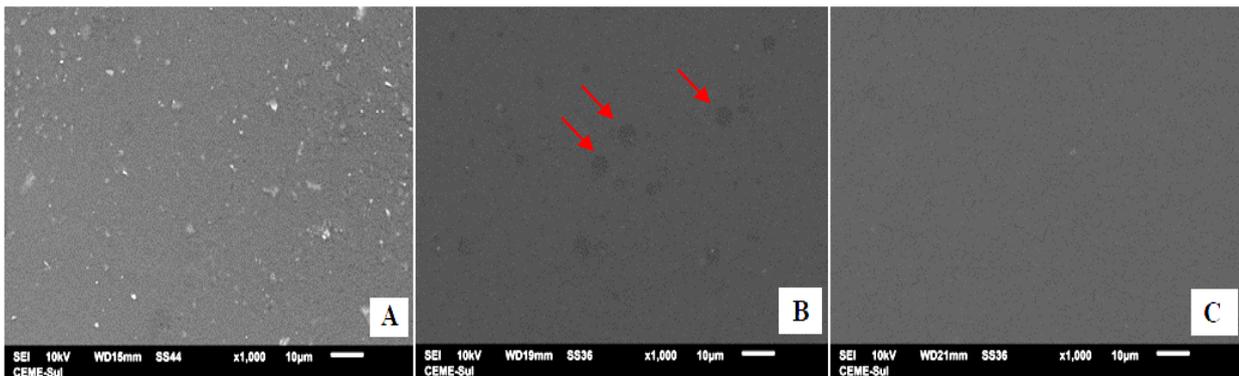
Um filme transparente permite que o produto embalado seja visto e é uma característica desejável para a embalagem de muitos alimentos. A opacidade é uma medida inversa de transparência do filme, ou seja, uma maior opacidade significa uma transparência menor (HU et al., 2018). As opacidades e transparências dos filmes de quitosana elaborados apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). O menor valor de opacidade encontrado foi para os filmes F1 (7,85), relacionado com a maior transparência (1,57), visto que nesta concentração os filmes apresentaram-se numa coloração clara, como observado na Figura 2. A maior opacidade (8,51) e menor transparência (1,06) foram verificadas para os filmes F2 que

apresentaram coloração amarela mais intensa. Além disso, a espessura elevada (0,098 mm) dos filmes F2 podem ter contribuído para o acréscimo da opacidade em relação aos demais filmes elaborados. Escárcega-Galaz et al. (2018) encontraram valor de transparência de 1,03 para filmes de quitosana na concentração 2% (m/v), similar ao encontrado neste estudo.

### 3.1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 3 apresenta a microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes F1 (A), F1.5 (B) e F2 (C), respectivamente. As morfologias dos filmes refletem o nível de interação entre os constituintes, principalmente, polímero e plastificante. Assim, a microestrutura do filme pode estar associada às suas propriedades de barreira, mecânicas e óticas (HOMEZ-JARA et al., 2018).

**Figura 3** – Microscopia eletrônica de varredura dos filmes à base de quitosana nas concentrações (A) 1, (B) 1,5 e (C) 2% (m/v)



O filme F1 (Figura 3A) apresentou a presença de partículas sólidas, que podem ter contribuído para a menor RT observada. O filme F1.5 (Figura 3B) apresenta gotículas de glicerol em sua superfície possivelmente em virtude da descontinuidade na interação polímero-plastificante. Conforme dito anteriormente, essas áreas de heterogeneidade nos filmes podem ter ocasionado a diminuição da ER. O filme F2 (Figura 3C) apresentou uma superfície sem rugosidades, uniforme e homogênea. Hafsa et al. (2016), avaliando filmes de quitosana na concentração 2% (m/v), também observaram o mesmo comportamento (superfície uniforme e sem rachaduras).

### 3.1.6 Propriedades térmicas

Para determinar as transições térmicas dos filmes à base de quitosana, foi realizado a calorimetria diferencial de varredura (DSC). Os resultados do DSC são apresentados na Tabela 2. Um pico endotérmico foi observado para todos os filmes, na faixa de 120 a 140 °C, relacionado à temperatura de fusão ( $T_f$ ). Para a temperatura de decomposição ( $T_d$ ), um pico exotérmico foi verificado para todos os filmes, na faixa de temperatura de 290 a 340 °C.

**Tabela 2** – Calorimetria diferencial de varredura dos filmes à base de quitosana

DSC	$T_f$ (°C)	$\Delta H_f$ (J/g)	$T_d$ (°C)	$\Delta H_d$ (J/g)
F1	136,74	78,84	336,57	-217,76
F1.5	121,60	15,47	290,05	-94,57
F2	129,26	12,78	292,85	-106,97

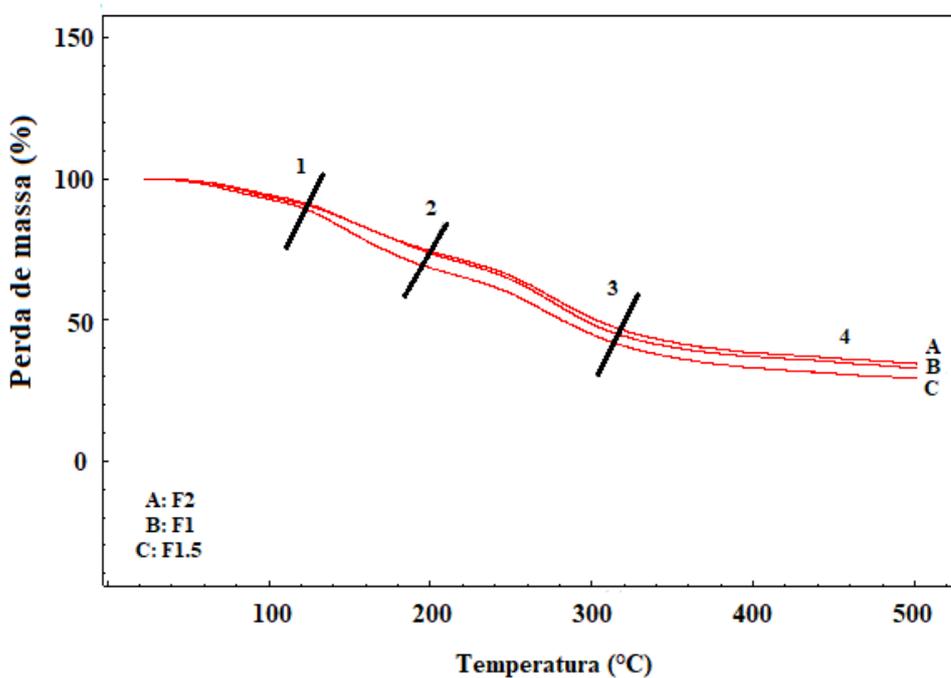
Com base nos resultados apresentados, foi possível verificar que os valores de entalpia ( $\Delta H$ ) foram inversamente proporcionais ao aumento da concentração de quitosana, ou seja, a energia requerida para que as transições ocorram diminui com o aumento da concentração. Entretanto, como os filmes F1.5 apresentaram descontinuidades nas interações polímero-plastificante, estes foram menos estáveis comparados a F1 e F2, necessitando de menor energia térmica para sua decomposição. Segundo Fundo et al. (2015), este comportamento em que uma maior concentração de quitosana resulta em um aumento na relação polímero-plastificante, o que afeta o volume livre entre as cadeias poliméricas, ocasionando conseqüentemente uma redução no nível de forças intermoleculares entre os polímeros, diminuindo a estabilidade térmica.

Comportamento similar ao deste estudo foi verificado por Homez-Jara et al. (2018) avaliando filmes de quitosana na concentração 0,5, 1 e 1,5% (m/v), secos a 25 °C. Na menor concentração (1%) observaram  $\Delta H_f$  de 205 J/g e na maior (1,5%)  $\Delta H_f$  de 151 J/g, verificando a relação inversa da energia com o aumento da concentração de quitosana, apesar dos valores mais elevados de  $\Delta H$  do que este estudo. Ainda, de acordo com os autores, um filme com uma estrutura ordenada é mais difícil de decompor do que um filme com uma rede desordenada, sendo influenciado diretamente pela interação polímero-plastificante. Lima et al. (2017) estudaram filmes de quitosana na concentração 1,5% (m/v) e observaram  $\Delta H_d$ -150 J/g, também superior ao deste estudo. As diferenças relatadas entre este estudo e os demais justificam-se pelas diferentes características das quitosanas empregadas na elaboração dos filmes. A

quitosana deste estudo foi produzida por processo misto com grau de desacetilação 80,17%, comparado aos estudos da literatura que utilizaram quitosanas comerciais com grau de desacetilação de 85% e 86,3%, respectivamente, influenciando diretamente nas propriedades e funcionalidades do polímero.

A perda de massa observada durante a degradação térmica foi avaliada pela análise termogravimétrica (TGA). A Figura 4 apresenta os resultados obtidos (%) para filmes à base de quitosana nas concentrações 1, 1,5 e 2% (m/v). De modo geral, os filmes nas diferentes concentrações apresentaram comportamentos muito similares, com 4 estágios de perda de massa. O primeiro estágio, em torno de 100-120 °C, refere-se à evaporação da água presente nos filmes. O segundo, torno de 200 °C, é associado à degradação do glicerol. O terceiro e o quarto estágio estão ligados à desidroxilação dos compostos orgânicos e degradação do polímero na faixa entre 250 e 450 °C.

**Figura 4** – Análise termogravimétrica dos filmes à base de quitosana



A perda de massa final dos filmes variou entre 64,39% (F1.5) e 69,05% (F2). Resultados semelhantes também foram observados por Homez-Jara et al. (2018) e Lima et al. (2017). Segundo Lima et al. (2017), a temperatura acima de 400 °C para a degradação final dos filmes deve-se ao elevado nível de interação entre os constituintes dos filmes, o que justifica o fato dos filmes F1.5 apresentarem a menor perda de massa, visto que estes apresentavam heterogeneidades nas interações.

## 3.2 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE

### 3.2.1 Atividade antimicrobiana

A Tabela 3 apresenta os halos de inibição (mm) apresentados pelos filmes à base de quitosana frente aos micro-organismos *S. aureus* (gram-positivo) e *E. coli* O157:H7 (gram-negativo). Muitos métodos podem ser utilizados para a avaliação da atividade antimicrobiana. Entretanto, o método de disco-difusão em ágar é comumente aplicado para verificar o potencial antimicrobiano, onde o aumento no halo da zona de inibição resulta de uma amostra com potencial antimicrobiano superior, devido à difusão do composto ativo no meio (CLSI, 2018).

**Tabela 3** – Atividade antimicrobiana dos filmes à base de quitosana

Filmes	Halo de inibição (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
F1	NI	NI
F1.5	NI	NI
F2	5,20 ± 0,15	NI

Média±desvio padrão. ND = Não inibido.

Com base nos resultados apresentados foi observado que apenas o micro-organismo *S. aureus* foi inibido pela atividade antimicrobiana dos filmes de quitosana na maior concentração (2% m/v), com halos de inibição de 5,20 mm, como apresenta a Figura 5. A quitosana tem despertado interesse como agente antimicrobiano devido a seu caráter policatiónico que facilita sua interação com as membranas celulares microbianas, que são carregadas negativamente (MOUSAVI KHANEGHAH; HASHEMI; LIMBO, 2018). Entretanto, de acordo com Sebti e Coma (2002), como a quitosana está em uma forma sólida nos filmes, somente micro-organismos em contato direto com os sítios ativos da quitosana são inibidos, pois ela apresenta dificuldade em se difundir através do ágar. Isso explica o comportamento verificado neste estudo. A difusão depende do tamanho, forma e polaridade do material difusor. A estrutura química e o nível de reticulação dos filmes também afetam esse fenômeno (CAGRI et al., 2001). Diversos estudos (GÓMEZ-ESTACA et al., 2010; SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016; SOGUT; SEYDIM, 2018; 2019; TAKMA; KOREL, 2019) sugerem a incorporação de agentes antimicrobianos nos filmes à base de

quitosana visando incrementar a atividade, pois o antimicrobiano difuso ativamente aumenta o potencial antimicrobiano da quitosana.

**Figura 5** – Atividade antimicrobiana dos filmes à base de quitosana na concentração 2% (m/v)



Pereda et al. (2011), avaliando as soluções filmogênicas e os filmes compósitos de quitosana-gelatina pelo método disco-difusão frente aos micro-organismos *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes*, verificaram que os dois micro-organismos foram inibidos por todas as soluções filmogênicas testadas. Entretanto, para os filmes apenas *E. coli* foi inibida, confirmando o comportamento verificado neste estudo e descrito por Sebti e Coma (2002), sobre a difusão limitada da quitosana no ágar no método disco-difusão.

### 3.3 EFEITO DO USO DE FILMES BIOATIVOS NA CONSERVAÇÃO DOS FILÉS DE PEITO DE FRANGO

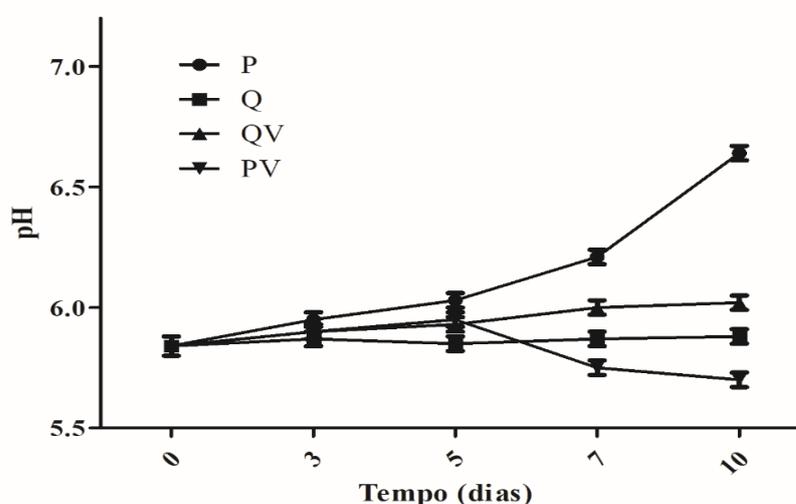
Os filmes elaborados com 2% (m/v) de quitosana apresentaram resistência à tração e alongação até ruptura de 19,79 MPa e 22,58%, superior ao verificado para as demais concentrações testadas, além da atividade antimicrobiana frente à *S. aureus*, sendo esses filmes escolhidos como melhor tratamento para a aplicação como filmes ativos.

#### 3.3.1 pH

A Figura 6 apresenta os valores de pH dos filés de frango revestidos com os filmes à base quitosana e com filmes de polietileno (controle), armazenados a 4 °C durante 10 dias. O valor de pH encontrado para amostras de filés de peito de frango, embalados com diferentes

tratamentos, foi de 5,84 no tempo zero de armazenamento. Segundo Olivo (2006), o pH inicial de aproximadamente 7,0 diminui para o pH final de 5,8 (*post mortem*), sendo esta diminuição dependente da atividade muscular, do grau de estresse e da concentração de glicogênio no momento do abate da ave. Portanto, resultados de pH acima ou abaixo de 5,8 são considerados anormais, pois influenciarão na qualidade, tanto funcional quanto microbiológica, da carne.

**Figura 6** – Comportamento do pH dos filés de peito de frango em diferentes condições de embalagem



P: Filme de polietileno. Q: Filme de quitosana (2% m/v); QV: Filme de quitosana e vácuo. PV: Filme de polietileno e vácuo. Os valores determinados para cada tratamento foram média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). A análise estatística está no Apêndice III.

No presente estudo, verificou-se um acréscimo significativo ( $p < 0,05$ ) no pH para os filés de frango revestidos com os filmes de polietileno (P) ao longo do tempo. Durante o armazenamento a 4 °C, o pH dos filés do tratamento P aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) de 5,84 para 6,59 no 10° dia de armazenamento. Segundo Cortez-Vega, Pizato e Prentice (2012), o aumento do pH em carnes de frango ocorre devido ao acúmulo de metabólitos de crescimento microbiano, como aminas e amônia produzidos por bactérias psicrótróficas. Entretanto, o tratamento Q, onde os filés foram revestidos com filmes de quitosana (2% m/v), permaneceu com pH inalterado durante todo experimento (5,84). O tratamento QV (filmes de quitosana e vácuo) também apresentou estabilidade no pH dos filés de frango, porém com valores superiores ao tratamento Q. Esse comportamento de estabilização do pH também foi verificado por Hassanzadeh et al. (2017), quando avaliaram o efeito do revestimento de quitosana, associado a irradiação gama, no prolongamento da vida útil da carne de frango,

durante o armazenamento refrigerado. Esses autores salientaram que o revestimento de quitosana proporciona a manutenção do valor de pH (5,8) constante durante o armazenamento e relataram que os valores de pH de todas as amostras revestidas com quitosana foram significativamente menores que o controle ( $p < 0,05$ ). Outros estudos anteriores (DUAN et al., 2010; FAN et al., 2009; YINGYUAD et al., 2006) também relataram que a aplicação de filmes à base de quitosana em carnes de frango poderia estabilizar o valor de pH durante o armazenamento em virtude da sua atividade antimicrobiana, que dificulta a multiplicação microbiana na superfície das amostras, retardando as alterações causadas no alimento.

No tratamento PV, onde os filés de frango foram embalados a vácuo em filmes de polietileno, a diminuição no pH pode estar relacionada ao aumento da contagem de bactérias lácticas, que são os micro-organismos predominantes em carnes nesse tipo de embalagem, e consequente produção de ácidos orgânicos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). O mesmo comportamento foi verificado por Sogut e Seydim (2018), observando uma diminuição no pH em filés de frango embalados a vácuo.

### 3.3.2 Cor

O acompanhamento nas mudanças de coloração da carne foi realizado durante os dez dias de armazenamento em refrigeração, como apresenta a Tabela 4. Em geral, todos os parâmetros de cor apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) ao longo dos dias de armazenamento, exceto para o tratamento P que não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para luminosidade entre os tempos zero e três. Relacionando os diferentes tratamentos no mesmo tempo de armazenamento, também foi possível verificar diferenças significativas para os parâmetros de cor ( $p < 0,05$ ), exceto para o croma  $a^*$  no sétimo dia de armazenamento refrigerado.

Os filmes de quitosana (Q) influenciaram a cor dos filés de frango, conferindo coloração mais escura à carne, em virtude do decréscimo significativo na luminosidade (53,47 no tempo 0 e 49,63 no tempo 10) e acréscimo nos valores de croma  $a^*$  (0,93 no tempo 0 e 1,07 no tempo 10), tendendo mais à cor vermelha comparado aos outros tratamentos. Nos tratamentos P e PV, onde as embalagens eram de polietileno, os valores de croma  $a^*$  tiveram um decréscimo significativo ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo, mostrando uma ligeira tendência para a coloração verde, o que pode ser explicado pela deterioração microbiana. A alteração na cor da carne acontece em função da destruição do complexo mioglobina pelo desenvolvimento microbiano, ou seja, os micro-organismos utilizam a mioglobina como nutriente,

desenvolvendo uma coloração que tende ao verde (ALCANTARA et al., 2012). Os valores de croma  $b^*$  também apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para os tratamentos durante o armazenamento, mostrando uma ligeira tendência para a coloração amarela nos filés de peito de frango nos tratamentos QV e PV. O tratamento QV (filmes de quitosana a vácuo) foi o que conferiu a maior manutenção das características de cor dos filés de frango em função do efeito sinérgico entre a quitosana, que diminuiu a multiplicação microbiana, e o vácuo, que através da remoção do ar, inibe o crescimento de micro-organismos aeróbios, a oxidação lipídica e a alteração na cor, mantendo as características sensoriais do produto, principalmente, o frescor (DEGIRMENCIOGLU et al., 2012).

**Tabela 4** – Avaliação da cor dos filés de frango em diferentes condições de embalagem durante o armazenamento refrigerado

Croma	Tempo (dias)	P	Q	QV	PV
$L^*$	0	53,47 ± 1,18 <sup>aD</sup>	53,47 ± 1,18 <sup>aA</sup>	53,47 ± 1,18 <sup>aB</sup>	53,47 ± 1,18 <sup>aC</sup>
	3	53,46 ± 0,31 <sup>aD</sup>	48,43 ± 1,50 <sup>dD</sup>	49,30 ± 0,08 <sup>cD</sup>	51,86 ± 0,72 <sup>bE</sup>
	5	54,35 ± 0,05 <sup>aC</sup>	45,76 ± 0,10 <sup>dE</sup>	49,23 ± 1,03 <sup>cE</sup>	52,41 ± 0,01 <sup>bD</sup>
	7	57,05 ± 0,10 <sup>aB</sup>	51,66 ± 0,23 <sup>dB</sup>	52,45 ± 0,16 <sup>cC</sup>	56,92 ± 0,18 <sup>bB</sup>
	10	58,98 ± 0,25 <sup>aA</sup>	49,63 ± 0,08 <sup>dC</sup>	55,06 ± 0,44 <sup>cA</sup>	57,97 ± 0,07 <sup>bA</sup>
$a^*$	0	0,93 ± 0,23 <sup>aA</sup>	0,93 ± 0,23 <sup>aE</sup>	0,93 ± 0,23 <sup>aC</sup>	0,93 ± 0,23 <sup>aA</sup>
	3	0,65 ± 0,03 <sup>cB</sup>	1,43 ± 0,24 <sup>bB</sup>	2,49 ± 0,02 <sup>aA</sup>	0,51 ± 0,15 <sup>dC</sup>
	5	0,21 ± 0,06 <sup>dC</sup>	1,98 ± 0,10 <sup>aA</sup>	1,61 ± 0,37 <sup>bB</sup>	0,60 ± 0,03 <sup>cB</sup>
	7	-0,16 ± 0,02 <sup>cD</sup>	1,14 ± 0,18 <sup>aC</sup>	1,01 ± 0,09 <sup>bD</sup>	-0,15 ± 0,03 <sup>cD</sup>
	10	-0,21 ± 0,005 <sup>cE</sup>	1,07 ± 0,04 <sup>aD</sup>	0,62 ± 0,04 <sup>bE</sup>	-0,73 ± 0,09 <sup>dE</sup>
$b^*$	0	11,86 ± 0,67 <sup>aA</sup>	11,86 ± 0,67 <sup>aB</sup>	11,86 ± 0,67 <sup>aD</sup>	11,86 ± 0,67 <sup>aB</sup>
	3	11,79 ± 0,47 <sup>bC</sup>	9,61 ± 0,74 <sup>dE</sup>	15,5 ± 0,05 <sup>aB</sup>	11,37 ± 0,35 <sup>cC</sup>
	5	10,78 ± 0,18 <sup>cE</sup>	13,14 ± 0,02 <sup>bA</sup>	16,11 ± 0,37 <sup>aA</sup>	10,06 ± 0,03 <sup>dE</sup>
	7	11,05 ± 0,11 <sup>cD</sup>	11,59 ± 0,56 <sup>aD</sup>	11,16 ± 0,20 <sup>bE</sup>	10,95 ± 0,15 <sup>dD</sup>
	10	11,83 ± 0,10 <sup>cB</sup>	11,75 ± 0,09 <sup>dC</sup>	13,08 ± 0,18 <sup>bC</sup>	13,12 ± 0,17 <sup>aA</sup>

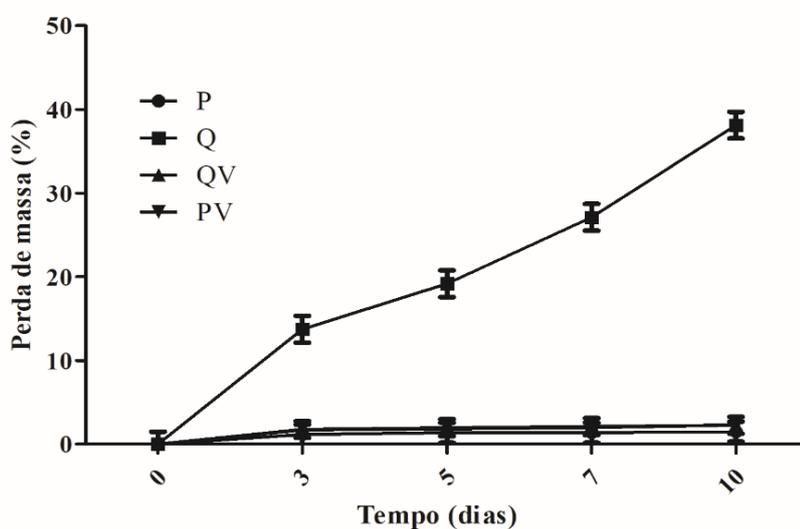
P: Filme de polietileno. Q: Filme de quitosana (2% m/v); QV: Filme de quitosana e vácuo. PV: Filme de polietileno e vácuo.  $L^*$ : luminosidade, varia de 0 (preto) a 100 (branco).  $a^*$ : coordenada do verde-vermelho (- $a^*$ : verde, + $a^*$ : vermelho).  $b^*$ : coordenada azul-amarelo (- $b^*$ : azul, + $b^*$ : amarelo). Média ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa entre as amostras para o mesmo tempo de armazenamento ( $p > 0,05$ ). Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa para cada amostra ao longo dos dias de armazenamento ( $p > 0,05$ ).

Comportamento similar ao deste estudo foi verificado por Sogut e Seydim (2019) quando avaliaram os efeitos de filmes à base de quitosana e poliprolactona incorporados ao extrato de semente de uva e nanocelulose, na qualidade de filés de peito de frango. Nos filmes de quitosana puros (1,5% m/v) os filés de frango também apresentaram os menores valores de  $L^*$  em comparação aos outros tratamentos testados. Segundo os autores, a diminuição dos valores de  $L^*$  pode estar relacionada à transferência de umidade da superfície para os filmes de quitosana, conforme também relatado por Soysal et al. (2015) durante a avaliação de filmes de nisina/quitosana em coxinhas de frango.

### 3.3.3 Perda de massa

A Figura 7 apresenta a perda de massa dos filés de peito de frango revestidos com os filmes à base de quitosana e com os filmes de polietileno (controle), armazenados a 4 °C durante 10 dias.

**Figura 7** – Perda de massa dos filés de peito de frango nas diferentes condições de embalagem durante o armazenamento a 4 °C



P: Filme de polietileno. Q: Filme de quitosana (2% m/v); QV: Filme de quitosana e vácuo. PV: Filme de polietileno e vácuo. Os valores determinados para cada tratamento foram média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). A análise estatística está no Apêndice III.

A perda de massa foi semelhante ao longo do tempo de armazenamento, para os tratamentos P, QV e PV, apresentando um acréscimo significativo ( $p < 0,05$ ), comparado com o tempo zero de armazenamento. Entretanto, a perda de massa foi significativamente superior

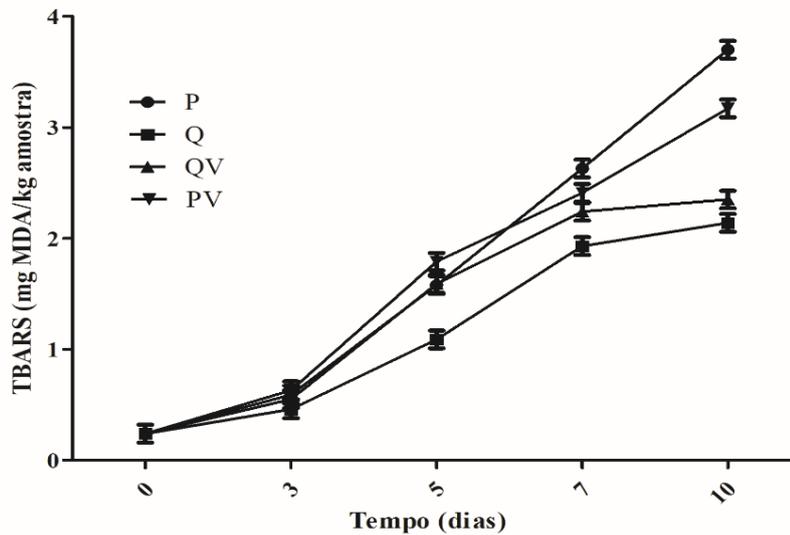
( $p < 0,05$ ) para o tratamento Q, que ao final do 10 ° dia de armazenamento apresentou uma perda de massa de 38,11%. Takma e Korel (2019) observaram comportamento similar ao deste estudo, quando avaliaram o efeito filmes de quitosana e alginato incorporado com óleo essencial de cominho preto no prolongamento da vida útil de filés de peito de frango, verificando aumento na perda de massa ao longo do armazenamento. Entretanto, a perda de massa final para os filmes de quitosana e alginato foi de 3% no 5° dia de armazenamento refrigerado, resultado muito inferior ao deste estudo visto a menor PVA dos filmes que diminuiu a transferência de água dos filés para o ambiente externo e conseqüente reduziu a perda da massa.

Cardoso (2014) verificou que filmes à base de quitosana e gelatina incorporados com óleo essencial, apresentaram uma perda de massa dos filés de carne bovina, de aproximadamente 12% após 5 dias de armazenamento, a qual foi associada a elevada PVA. No presente estudo, verificou-se que os filmes de quitosana 2% (m/v) apresentaram valores de PVA ainda mais elevados ( $6,31 \times 10^{-8}$  g mm/dia Pa cm<sup>2</sup>), devido as características estruturais e físico-químicas do polímero e a interação polímero-plastificante. Este fato pode estar relacionado com a maior perda de massa dos filés tratados com Q, contribuindo também para diminuição da multiplicação microbiana, em virtude da possível diminuição do conteúdo de água nos filés.

### **3.3.4 Estabilidade lipídica (TBARS)**

A Figura 8 apresenta a avaliação da estabilidade lipídica dos filés de peito de frango embalados com os filmes de quitosana e controle (polietileno). No tempo zero, os filés de peito de frango apresentaram valores de TBARS de 0,24 mg MDA/kg de amostra. Ao longo do tempo de armazenamento, foi possível verificar que os valores de malondialdeído (MDA) apresentaram um acréscimo significativo ( $p < 0,05$ ) para todos os tratamentos, sendo influenciado pelo material de embalagem. Como era esperado, o tratamento P apresentou maior conteúdo de TBARS (3,70 mg MDA/kg de amostra) em relação aos demais. O tratamento Q apresentou a menor oxidação lipídica (2,14 mg MDA/kg de amostra), em relação ao P e PV, respectivamente. O tratamento QV foi significativamente superior ( $p < 0,05$ ) ao Q, porém inferior ao P e ao PV, demonstrando efeito positivo como revestimento dos filés frente às condições de embalagem convencionais. Segundo Kurek et al. (2019), a atividade antioxidante da quitosana pode ser atribuída à sua capacidade de eliminação de radicais livres, quelação de íons metálicos e poder redutor. Essa capacidade pode estar relacionada e contribuir para a inibição da peroxidação lipídica em alimentos quando revestidos com filmes à base de quitosana.

**Figura 8** – Avaliação da estabilidade lipídica dos filés de peito de frango embalados em diferentes condições de embalagem pelo método TBARS



P: Filme de polietileno. Q: Filme de quitosana (2% m/v); QV: Filme de quitosana e vácuo. PV: Filme de polietileno e vácuo. Os valores determinados para cada tratamento foram média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). A análise estatística está no Apêndice III.

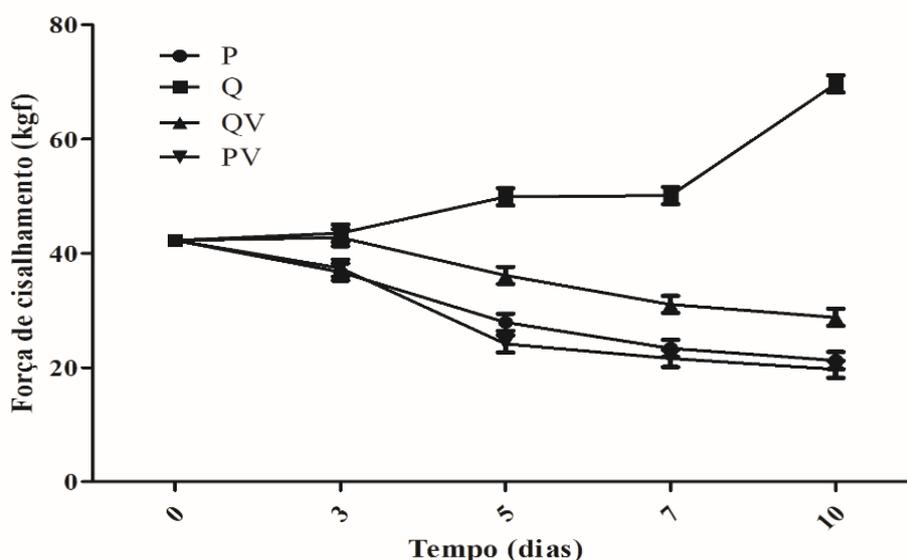
Sogut e Seydim (2018), avaliando filmes comestíveis à base de quitosana e extrato de semente de uva na qualidade de filés de peito de frango embalados a vácuo durante 15 dias de armazenamento refrigerado, verificaram comportamento semelhante ao deste estudo. Os autores encontraram valor de TBARS inicial de 0,20 mg MDA/kg para os filés de frango e observaram que o tempo de armazenamento e o material de embalagem afetaram a oxidação lipídica dos filés. O tratamento controle (sem revestimento) atingiu TBARS de 5,30 mg MDA/kg de amostra no 15<sup>o</sup> dia de armazenamento, significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que os tratamentos com quitosana e extrato de semente de uva a vácuo em diferentes concentrações. O mesmo comportamento foi verificado por Sogut e Seydim (2019) e Hassanzadeh et al. (2017), demonstrando que os filmes de quitosana podem auxiliar no controle da oxidação lipídica, visto que esta é iniciada logo após o abate e se desenvolve até níveis inaceitáveis durante o armazenamento.

### 3.3.5 Força de cisalhamento

A avaliação instrumental da textura, verificando a maciez e a resistência ao corte das carnes, é realizada amplamente pela mensuração da força de cisalhamento com lâmina Warner-Bratzler (PINTO; PONSANO; ALMEIDA, 2010). A Figura 9 apresenta a força de

cisalhamento (FC) (kgf) para filés de peito de frango embalados em diferentes condições de embalagem.

**Figura 9** – Força de cisalhamento (FC) para avaliação instrumental da textura dos filés de peito de frango em diferentes condições de embalagem



P: Filme de polietileno. Q: Filme de quitosana (2% m/v); QV: Filme de quitosana e vácuo. PV: Filme de polietileno e vácuo. Os valores determinados para cada tratamento foram média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). A análise estatística está no Apêndice III.

A FC nos tratamentos diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) ao longo dos dias de armazenamento refrigerado, exceto para o tratamento Q (filmes de quitosana) que tiveram um acréscimo significativo ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo. O aumento da FC do tratamento Q pode ter ocorrido devido a elevada permeabilidade ao vapor de água dos filmes, que facilitou a transferência de água contida nos filés de peito de frango para o ambiente externo, tornando-os mais enrijecidos e difíceis de serem cisalhados. Dentre os tratamentos que apresentam diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da FC, o QV apresentou menor redução (31,85%), devido a atividade antimicrobiana da quitosana que diminuiu a multiplicação de micro-organismos e o vácuo que diminuiu a transferência de água, favorecendo a manutenção da textura. Os tratamentos P e PV reduziram a textura em 49,77% e 53,37%, respectivamente, relacionando-se principalmente à degradação pela atividade microbiana e autólise enzimática que causa perdas na estrutura proteica e amolecimento da coesão tecidual. A textura é um dos critérios de qualidade mais importantes em qualquer tipo de carne porque está associada a aceitação do consumidor (CORTEZ-VEGA; PIZATO; PRENTICE, 2012).

Comportamento similar ao deste estudo foi verificado por Abdou, Galhoum e Mohamed (2018), quando avaliaram revestimentos de pectina e nanoemulsões carregadas com curcumina para o prolongamento da vida útil de filés de frango refrigerados. Esses autores observaram que a FC de todos os tratamentos avaliados diminuiu ao longo do tempo de armazenamento. Entretanto, como a curcumina é um composto com atividade antimicrobiana, assim como a quitosana, quando comparada aos demais tratamentos do estudo, foi o tratamento com menor redução no parâmetro de avaliação da textura.

### 3.3.6 Análises microbiológicas

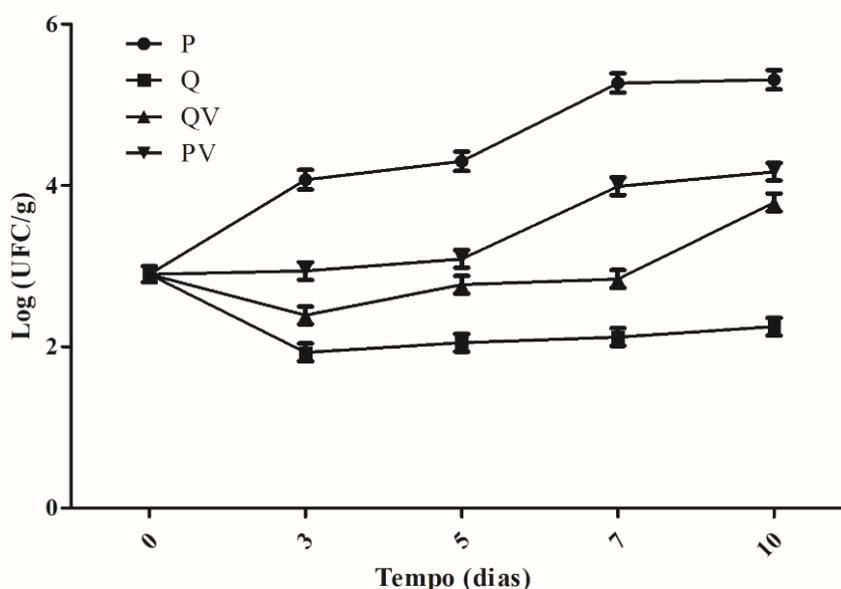
No tempo zero, os filés de peito de frango, do tipo *Sassami*, foram avaliados quanto a contagem inicial microbiana para avaliar a condição do alimento e verificar posteriormente a possibilidade de prolongação da vida útil desse produto, através do efeito antimicrobiano da embalagem desenvolvida com filmes à base de quitosana. A contagem inicial dos filés estava entre 2 e 3 log UFC/g para enterobactérias, bactérias lácticas e mesófilos aeróbios totais e para *Pseudomonas* spp. de 3,73 log UFC/g. Bazargani-Gilani, Aliakbarlu e Tajik (2015) verificaram contagem inicial, para o mesmo grupo de micro-organismos, entre 3 e 5 log UFC/g, avaliando filés de frango embalados com filmes de quitosana enriquecidos com óleo essencial de *Zataria multiflora*. Assim, pode-se observar que os filés utilizados neste estudo encontravam-se em condição satisfatória.

Com base nos resultados, durante a avaliação ao longo dos dez dias de armazenamento refrigerado, foi possível verificar que as contagens microbianas, como era esperado, tiveram um aumento mais pronunciado ( $p < 0,05$ ) nos filés de peito de frango embalados com filmes de polietileno (P e PV). Os filmes de quitosana (Q e QV) reduziram ou controlaram a multiplicação microbiana devido à ação antimicrobiana do polímero e a diminuição do conteúdo de água disponível para o crescimento microbiano nos filés do tratamento Q, em virtude da elevada PVA dos filmes que propiciou a transferência água dos filés para o ambiente externo.

Os filmes de quitosana apresentaram maior inibição ( $p < 0,05$ ) dos mesófilos aeróbios totais (Figura 10), *Pseudomonas* spp. (Figura 11) e bactérias ácido lácticas (Figura 12), em relação as contagens iniciais. Os mesófilos aeróbios totais são um grupo de micro-organismos que, quando presentes em números elevados nos alimentos, poderão causar a deterioração e/ou a redução da vida útil do alimento. Esta contagem é comumente empregada para indicar a qualidade sanitária dos alimentos, ou seja, utilizada como um indicador geral de

contaminação do alimento, por isso em contagens elevadas, o alimento é dito insalubre (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A Figura 10 apresenta as contagens para os mesófilos aeróbios totais nos filés de peito de frango.

**Figura 10** - Contagem de mesófilos aeróbios totais nos filés de peito de frango em diferentes condições de embalagem



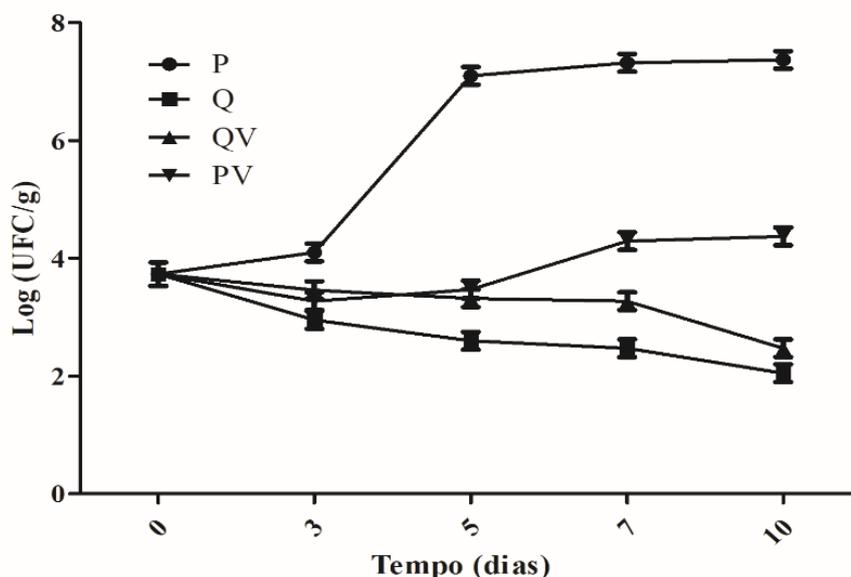
P: Filme de polietileno. Q: Filme de quitosana (2% m/v); QV: Filme de quitosana e vácuo. PV: Filme de polietileno e vácuo. Os valores determinados para cada tratamento foram média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). A análise estatística está no Apêndice III.

De acordo com Economou et al. (2009), a contagem de mesófilos aeróbios totais inicial deste estudo (tempo zero) (2,90 log UFC/g) está de acordo com os resultados para carne de frango *in natura* (4,3 log UFC/g). Ao final do 10º dia de armazenamento refrigerado a contagem de mesófilos atingiu 5,31 log UFC/g para o tratamento P e 2,25 para o tratamento Q. Desta maneira, foi possível verificar que a quitosana teve um efeito antimicrobiano positivo sobre o grupo de micro-organismos, visto sua densidade de carga positiva que possibilita a interação com as paredes celulares microbianas carregadas negativamente, ocasionando lesões e levando a perda da viabilidade celular, demonstrando potencial para o prolongamento da vida útil (MOUSAVI KHANEGHAH; HASHEMI; LIMBO, 2018).

*Pseudomonas* spp. são encontradas em alimentos refrigerados e congelados, de origem animal ou vegetal. São bactérias importantes devido a sua intensa atividade metabólica, sendo capazes de produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas, causando alterações nos alimentos

(FRANCO; LANDGRAF, 2008). A Figura 11 apresenta as contagens para *Pseudomonas* spp. nos filés de peito de frango.

**Figura 11** - Contagem de *Pseudomonas* spp. nos filés de peito de frango em diferentes condições de embalagem



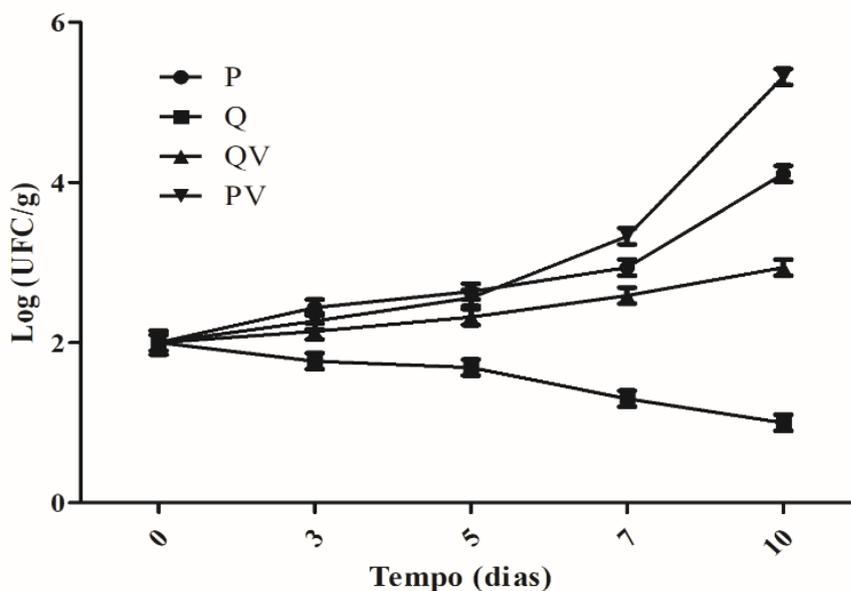
P: Filme de polietileno. Q: Filme de quitosana (2% m/v); QV: Filme de quitosana e vácuo. PV: Filme de polietileno e vácuo. Os valores determinados para cada tratamento foram média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). A análise estatística está no Apêndice III.

Para *Pseudomonas* spp., também foi verificado acréscimo significativo ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo para o tratamento P (7,37 log UFC/g) e redução significativa ( $p < 0,05$ ) para os tratamentos Q (2,05 log UFC/g) e QV (2,47 log UFC/g). Esses micro-organismos formam parte significativa da microflora de deterioração da carne de frango, armazenada sob refrigeração, podendo levar a produção do pigmento pioverdina e causar odores alterados, sinalizando a deterioração do produto (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). Em vista disso, foi possível verificar que os filmes de quitosana inibem a multiplicação destas bactérias, demonstrando ser uma alternativa viável para o prolongamento da vida útil deste alimento.

A Figura 12 apresenta as contagens para bactérias ácido láticas nos filés de peito de frango. As bactérias láticas estão presentes em quase todo tipo de produto cárneo fresco ou curado e nos produtos embalados sob condição de anaerobiose. Enquanto em alguns tipos de embutidos a fermentação láctica é estimulada, em outros casos ela pode ser responsável pela

formação de limo, pode causar tendência a coloração verde e levar a acidificação do produto (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

**Figura 12** - Contagem de bactérias ácido lácticas nos filés de peito de frango em diferentes condições de embalagem

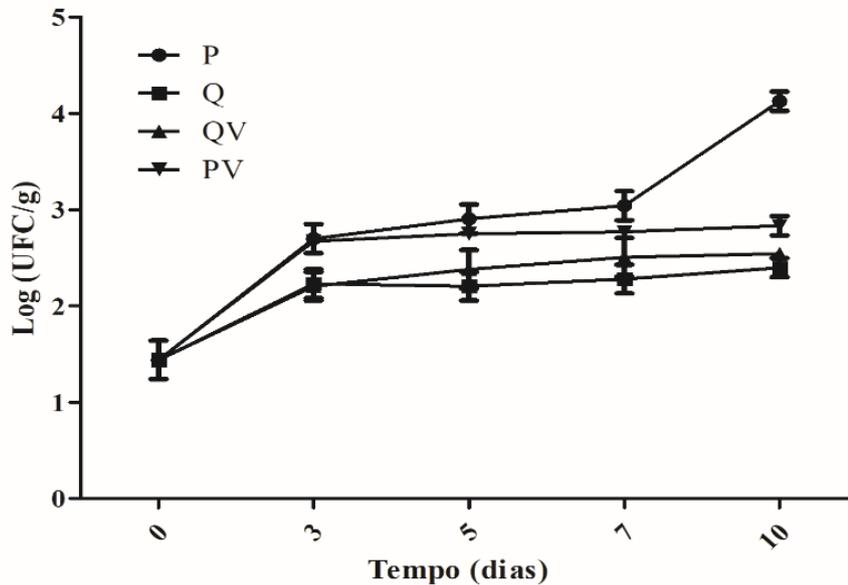


P: Filme de polietileno. Q: Filme de quitosana (2% m/v); QV: Filme de quitosana e vácuo. PV: Filme de polietileno e vácuo. Os valores determinados para cada tratamento foram média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). A análise estatística está no Apêndice III.

Todos os tratamentos apresentam acréscimos significativos ( $p < 0,05$ ) nas contagens de bactérias ácido lácticas, exceto para o tratamento Q, que apresentou redução significativa das contagens ( $p < 0,05$ ). Nos filés embalados com o tratamento PV, como era esperado, ocorreu a maior multiplicação microbiana, pois essas bactérias crescem rapidamente em condições a vácuo (*Lactobacillus*, *Carnobacterium* e *Leuconostoc*) (RODRIGUEZ et al, 2014). Logo, foi possível observar que no tratamento QV houve um efeito sinérgico entre a quitosana e o vácuo visto que não houve crescimento pronunciado das bactérias lácticas nos filés deste tratamento.

Para enterobactérias e psicrotóxicos todos os tratamentos apresentaram aumento significativo nas contagens ( $p < 0,05$ ). As enterobactérias fazem parte da microbiota intestinal do homem e pertencem ao grupo dos coliformes, representando também um indicador de qualidade sanitária dos alimentos. A Figura 13 apresenta a contagem para enterobactérias nos filés de peito de frango.

**Figura 13** - Contagem de enterobactérias nos filés de peito de frango em diferentes condições de embalagem

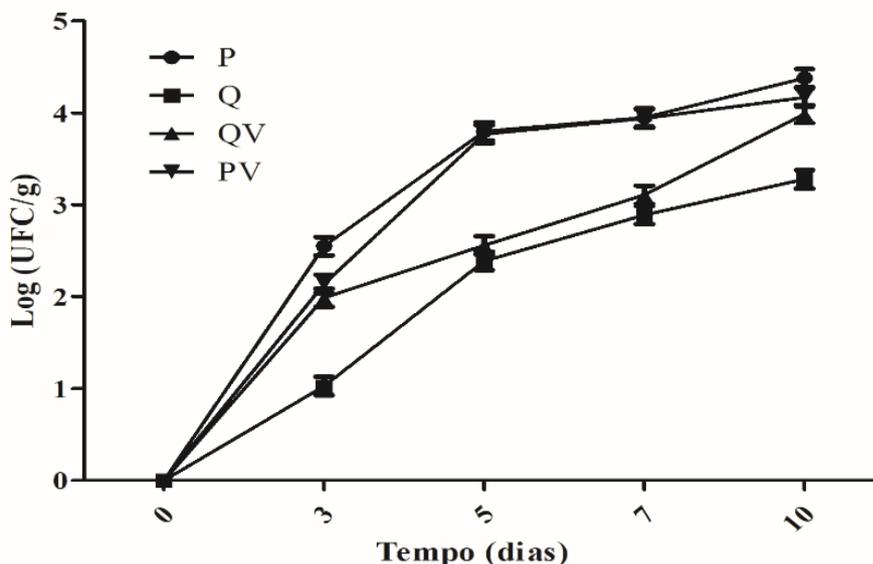


P: Filme de polietileno. Q: Filme de quitosana (2% m/v); QV: Filme de quitosana e vácuo. PV: Filme de polietileno e vácuo. Os valores determinados para cada tratamento foram média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). A análise estatística está no Apêndice III.

Resultados superiores ao deste estudo foram descritos por Bazargani-Gilani, Aliakbarlu e Tajik (2015) para a contagem de enterobactérias. Esses autores verificaram que a contagem inicial de 3,44 log UFC/g subiu significativamente ( $p < 0,05$ ) para 4,9 log UFC/g nos filmes de quitosana com óleo essencial de *Z. multiflora* em 10 dias de armazenamento refrigerado, diferentemente deste estudo onde a contagem inicial foi de 1,44 log UFC/g e para os filés embalados com os filmes de quitosana ao final dos dez dias de armazenamento foi de 2,39 log UFC/g. Essas diferenças podem ocorrer devido as diferentes quitosanas empregadas, que podem apresentar características diferentes, especialmente em relação ao grau de desacetilação e densidade de carga positiva, influenciando a ação antimicrobiana do polímero.

A contagem de bactérias psicotróficas avalia o grau de deterioração de alimentos refrigerados (FRANCO; LANDGRAF, 2008). O efeito antimicrobiano dos filmes à base de quitosana também pode ser observado na contagem de bactérias psicotróficas, como apresenta a Figura 14.

**Figura 14** - Contagem de bactérias psicrotróficas nos filés de peito de frango em diferentes condições de embalagem



P: Filme de polietileno. Q: Filme de quitosana (2% m/v); QV: Filme de quitosana e vácuo. PV: Filme de polietileno e vácuo. Os valores determinados para cada tratamento foram média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). A análise estatística está no Apêndice III.

No tempo zero, os filés de peito de frango não apresentaram contagens para as bactérias psicrotróficas. Entretanto, no tempo 10, a contagem final para o tratamento foi de 4,38 log UFC/g, significativamente superior ( $p < 0,05$ ) que Q (3,28 log UFC/g), demonstrando mais uma vez a eficiência dos filmes de quitosana na redução da multiplicação microbiana.

#### 4 CONCLUSÃO

Os filmes elaborados à base de quitosana proveniente de subprodutos industriais de crustáceos apresentaram-se contínuos, flexíveis e manuseáveis. Contudo, na concentração 1,5% (m/v) apresentaram zonas de heterogeneidade, indicando falta de interação do polímero com o plastificante e influenciando diretamente nas suas propriedades. O aumento na concentração de quitosana resultou em filmes mais resistentes e solúveis. Além disso, o acréscimo na concentração do polímero também intensificou a cor amarela dos mesmos, porém tornou-os mais opacos. Os filmes apresentaram elevada permeabilidade ao vapor de água e, por isso, quando foram aplicados como embalagem ativa na conservação de filés de peito de frango, do tipo *Sassami*, foi possível observar o escurecimento e o enrijecimento dos filés devido a transferência de água para o ambiente externo. Por outro lado, os filmes de quitosana

diminuíram ou controlaram a multiplicação dos micro-organismos avaliados e retardaram a oxidação lipídica. Sendo assim, de modo geral, pode-se concluir que os filmes de quitosana, produzida a partir dos subprodutos do caranguejo vermelho por processo misto, demonstram potencial para aplicação em alimentos, reduzindo a deterioração.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOU, E. S.; GALHOUM, G. F.; MOHAMED, E. N. Curcumin loaded nanoemulsion/pectin coating for refrigerated chicken fillets. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 445-453, 2018.
- AGUIRRE-LOREDO, R. Y.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A. I.; MORALES-SÁNCHEZ, E.; GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; VELAZQUEZ, G. Effect of equilibrium moisture content on barrier, mechanical and thermal properties of chitosan films. **Food Chemistry**, v. 196, p. 560-566, 2016.
- ALCANTARA, M.; MORAIS, I. C. L.; SOUZA, C. M.; CORRÊA, O. C. Principais microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v. 6, n. 1, p. 1-20, 2012.
- ALVARADO, S.; SANDOVAL, G.; PALOS, I.; TELLEZ, S.; AGUIRRE-LOREDO, Y.; VELAZQUEZ, G. The effect of relative humidity on tensile strength and water vapor permeability in chitosan, fish gelatin and transglutaminase edible films. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 690-695, 2015.
- ANTUNES-VALCAREGGI, S. A.; FERREIRA, S. R.S; HENSE, H. Enzymatic hydrolysis of Blue Crab (*Callinectes Sapidus*) waste processing to obtain chitin, protein, and astaxanthin-enriched extract. **International Journal of Environmental & Agriculture Research**, v. 3, p. 81-92, 2017.
- ARANCIBIA, M. Y.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Chitosan coatings enriched with active shrimp waste for shrimp preservation. **Food Control**, v. 54, p. 259-266, 2015.
- ASSIS, O. B. G. Change in hydrophilic characteristics of chitosan films by hmms plasma treatment. **Química Nova**, v. 33, n. 3, 2010.
- ASTM. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. **In: Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials, Designation D882-12**, West Conshohocken: ASTM International 2012.
- ASTM. Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. **In: Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials, Designation E96-00**, West Conshohocken: ASTM International 2012.
- BAZARGANI-GILANI, B.; ALIAKBARLU, J.; TAJIK, H. Effect of pomegranate juice dipping and chitosan coating enriched with Zataria multiflora Boiss essential oil on the shelf-

life of chicken meat during refrigerated storage. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 29, p. 280-287, 2015.

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E. T.; CAPRIOLI, L. Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. **Journal of Food Science**, v. 66, p. 865-870, 2001.

CARDOSO, G. P. **Revestimentos comestíveis à base de gelatina, glicerina, quitosana e óleos essenciais para conservação de carne bovina refrigerada**. 2014. 220 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

CESTARI, A. R.; VIEIRA, E. F. S.; TAVARES, A. M. G.; BRUNS, R. E. The removal of the indigo carmine dye from aqueous solutions using cross-linked chitosan: Evaluation of adsorption thermodynamics using a full factorial design. **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, p. 566-574, 2008.

CHO, Y.; HAN, S.; YAN, X.; KO, S. PVA containing chito-oligosaccharide side chain. **Polymer**, v. 41, n. 6, p. 2033-2039, 2000.

CIE. **Colorimetry**. 2 ed. Wien: Commission International de l'Éclairage, 1986.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test**. 13 ed. Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute, 2018. 92 p.

CORTEZ-VEGA, W. R.; PIZATO, S.; PRENTICE, C. Quality of raw chicken breast stored at 5 °C and packaged under different modified atmospheres. **Journal of Food Safety**, v. 32, n. 3, 2012.

CRACKEL, 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.

DEGIRMENCIOGLU, N.; ESMER, O. K.; IRKIN, R.; DEGIRMENCIOGLU, A. Effects of vacuum and modified atmosphere packaging on shelf life extension of minced meat chemical and microbiological changes. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, n. 7, p. 898-911, 2012.

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

DUN, Y.; LI, Y.; XU, J.; HU, Y.; ZHANG, C.; LIANG, Y.; ZHAO, S. Simultaneous fermentation and hydrolysis to extract chitin from crayfish shell waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 420-426, 2019.

ECONOMOU, V.; ZISIDES, N.; GOUSIA, P.; PETSIOS, S.; SAKKAS, H.; SOULTOS, N.; PAPADOPOULOU, C. Prevalence and antimicrobial profile of *Camylobacter* isolates from free-range and conventional farming chicken meat during a 6-year survey. **Food Control**, v. 56, p. 161-168, 2015.

- ELSABEE, M. Z.; ABDOU, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering**, v. 33, n. 4, p. 1819-1841, 2013.
- ESCÁRCEGA-GALAZ, A. A.; SÁNCHEZ-MACHADO, D. I.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; SANCHES-SILVA, A.; MADERA-SANTARA, T. J.; PASEIRO-LOSADA, P. Characterization data of chitosan-based films: Antimicrobial activity, thermal analysis, elementary composition, tensile strength and degree crystallinity. **Data in Brief**, v. 21, p. 473-479, 2018.
- FAN, W.; SUN, J.; CHEN, Y.; QIU, J.; ZHANG, Y.; CHI, Y. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. **Food Chemistry**, v. 115, p. 66-70, 2009.
- FERREIRA, A. S.; NUNES, C.; CASTRO, A.; FERREIRA, P.; COIMBRA, M. A. Influence of grape pomace extract incorporation on chitosan films properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 490-499, 2014.
- FRANCO; B. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.
- FUNDO, J. F.; CARVALHO, A.; FEIO, G.; SILVA, C. L. M.; QUINTAS, M. A. C. Relationship between molecular mobility, microstructure and functional properties in chitosan/glycerol films. **Innovative Food & Emerging Technologies**, v. 28, p. 81-85, 2015.
- GÓMEZ-ESTACA, J.; CALVO, M. M.; ÁLVAREZ-ACERO, I.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Characterization and storage stability of astaxanthin esters, fatty acid profile and -tocopherol of lipid extract from shrimp (*L. vannamei*) waste with potential applications as food ingredient. **Food Chemistry**, v. 216, p. 37-44, 2017.
- HAFSA, J.; SMACH, M. A.; KHEDHER, M. R. B.; CHARFEDDINE, B.; LIMEM, K.; MAJDOUB, H.; ROUATBI, S. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. **LWT – Food Science and Technology**, v. 68, p. 356-364, 2016.
- HAMDI, M.; HAJJI, S.; AFFES, S.; TAKTAK, W.; MAÂLEJ, H.; NASRI, M.; NASRI, R. Development of a controlled bioconversion process for the recovery of chitosan from blue crab (*Portunus segnis*) exoskeleton. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 534-548, 2018.
- HAN, J. H.; KROCHTA, J. M. Water vapor permeability and wetting properties of whey protein coating on paper. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, v. 42, p. 1375-1382, 1999.
- HASSANZADEH, P.; TAJIK, H.; ROHANI, S. M. R.; MORADI, M.; HASHEMI, M.; ALIAKBARLU, J. Effect of functional chitosan coating and gamma irradiation on the shelf-life of chicken meat during refrigerated storage. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 141, p. 103-109, 2017.
- HOMEZ-JARA, A.; DAZA, L. D.; AGUIRRE, D. M.; MUÑOZ, J. A.; SOLANILLA, J. F.; VÁQUIRO, H. A. Characterization of chitosan edible films obtained with various polymer

concentrations and drying temperatures. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1233-1240, 2018.

HU, Z. Y.; WANG, P. P.; FU, E. G.; WANG, X. J.; YAN, X. Q.; XU, P.; WU, Z. M.; ZHAO, Y. B.; LIANG, Y. X. Bilayer nanoporous copper films with various morphology features synthesized by one-step dealloying. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 754, p. 26-31, 2018.

JAY, J. M.; LOESNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7 ed. New York: Chapman and Hall, 2005. 319 p.

KNIDRI, H. E.; BELAABED, R.; ADDAOU, A.; LAAJEB, A.; LAHSINI, A. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1191-1189, 2018.

KUMAR, B.; SMITA, K.; CUMBAL, L.; DEBUT A. Synthesis of silver nanoparticles using sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) leaf extracts. **Saudi Journal Biological Science**, v. 21, p. 605–609, 2014.

LATOU, E.; MEXIS, S. F.; BADEKA, A.V.; KOTANKOS, S.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of chitosan and modified atmosphere packaging for shelf life extension of chicken breast fillets. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 263-268, 2014.

LIMA, M. M.; CARNEIRO, L. C.; BIANCHINI, D.; DIAS, A. R.; ZAVAREZE, E. D.; PRENTICE, C.; MOREIRA, A. D. Structural, Thermal, Physical, Mechanical, and Barrier Properties of Chitosan Films with the Addition of Xanthan Gum. **Journal of Food Science**, v. 82, n.3, p. 698-705, 2017.

LOPES, C.; ANTELO, L. T.; FRANCO-URÍA, A.; ALONSO, A. A.; PÉREZ-MARTÍN, R. Chitin production from crustacean biomass: Sustainability assessment of chemical and enzymatic processes. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 4140-4151, 2018.

MEI, J.; YAUN, Y.; WU, Y.; LI, Y. Characterization of edible starch-chitosan film and its application in the storage of Mongolian cheese. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 57, p. 17-21, 2013.

MILKOVA, V.; RADEVA, T. Influence of charge density and calcium salt on stiffness of polysaccharides multilayer film. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 481, p. 13–19, 2015.

MOURA, J. M.; FARIAS, B. S.; RODRIGUES, D. A. S.; MOURA, C. M.; DOTTO, G. L.; PINTO, L. A. A. Preparation of chitosan with different characteristics and its application for biofilms production. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 23, p. 470-477, 2015.

MOUSAVI KHANEGHAH, A.; HASHEMI, S. M. B.; LIMBO, S. Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. **Food and Bioproducts Processing**, v. 111, p 1-19, 2018.

OLIVO, R. **O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango**. Criciúma: [s.n], 2006.

- PASTOR, C.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHIRALT, A.; CHAFÉR, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Physical and antioxidant properties of chitosan and methycellulose based films containing resveratrol. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 272-280, 2013.
- PEREDA, M.; PONCE, A. G.; MARCOVICH, N. E.; RUSECKAITE, R. A.; MARTUCII, J. F. Chitosan-gelation composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1372-1381, 2011.
- PEREDA, M.; DUFRESNE, A.; ARANGUREN, M. I.; MARCOVICH, N. E. Polyelectrolyte films based on chitosan/olive oil and reinforced with cellulose nanocrystals. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1018-1026, 2014.
- PINTO, M. F.; PONSANO, E. H. G.; ALMEIDA, A. P. S. Espessura da lâmina de cisalhamento na avaliação instrumental da textura da carne. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1405-1410, 2010.
- POLA, C. C.; MEDEIROS, E. A. A.; PEREIRO, O. L.; SOUZA, V. G. L.; OTONI, C. G.; CAMILLOTO, G. P.; SOARES, N. F. F. Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fung. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 9, p. 69-78, 2016.
- PRIYADARSKI, R.; NEGI, Y. S. Effect of varying filler concentration on Zinc Oxide nanoparticle embedded chitosan films as potential food packaging material. **Journal of Polymers and The Environment**, v. 25, n. 4, p. 1087-1098, 2017.
- PRIYADARSHI, R.; SAURAJ, S.; KUMAR, B.; NEGI, Y. S. Chitosan film incorporated with citric acid and glycerol as an active packaging material for extension of green chilli shelf life. **Carbohydrate Polymers**, v. 195, p. 329-338, 2018.
- RAEISI, M.; TABARAEI, A.; HASHEMI, M.; BENHAMPOUR, N. Effect of sodium alginate coating incorporated with nisin, *Cinnamomum zeylanicum*, and rosemary essential oils on microbial quality of chicken meat and fate of *Listeria monocytogenes* during refrigeration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 139-145, 2016.
- RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. ARACHCHI, J. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 531-539, 2009.
- SEBTI, I.; COMA, V. Active edible polysaccharide coating and interactions between solution coating compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 2, p. 139-144, 2002.
- SHOJAEI-ALIABADI, S.; HOSSEINI, H.; MOHAMMADIFAR, M. A.; MOHAMMADI, A.; GHASEMLOU, M.; OJAGH, S. M.; HOSSEINI, S. M.; KHAKSAR, R. Characterization of antioxidant-antimicrobial k-carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, p. 116-124, 2013.
- SIRIPATRAWAN, U.; VITTHAYAKITTI, W. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 695-702, 2016.

SOBRAL, P. J. A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 6, p. 1251-1259, 2000.

SOGUT, E.; SEYDIM, A. C. The effects of chitosan and grape seed extract-based edible films on the quality of vacuum packaged chicken breast fillets. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 18, p. 13-20, 2018.

SOGUT, E.; SEYDIM, A. C. The effects of chitosan and polycaprolactone-based bilayer films incorporated with grape seed extract and nanocellulose on the quality of chicken breast fillets. **LWT - Food Science and Technology**, v. 101, p. 799-805, 2019.

SOTHORNVIT, R.; KROCHT, J. M. Plasticizers in edible films and coating. **Innovations in Food Packaging**, v. 24, p. 403-433, 2005.

SOUZA, S. O.; D'ERRICO, F.; AZIMI, B.; BALDASSARE, A.; ALVES, A. V. S.; VALENÇA, J. V. B.; BARROS, V. S. M.; CASCONI, M. G. CASCONI; LAZZERI, L. OSF films for in-vivo entrance dose measurements. **Radiation Measurements**, v. 106, p. 644-649, 2017.

SOYSAL, Ç.; BOZKURT, H.; DIRICAN, E.; GUÇLU, M.; BOZHUYUK, E. D.; USLU, A. E.; KAYA, S. Effect of antimicrobial packaging on physicochemical and microbial quality of chicken drumsticks. **Food Control**, v. 54, p. 294-299, 2015.

SU, J.; HUANG, Z.; ZHAO, Y.; YUAN, X.; WANG, X.; LI, M. Moisture sorption and water vapor permeability of soy protein isolate/poly(vinylalcohol)/glycerol blend films. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 2, p. 266-276, 2010.

SZYMÁŃSKA, E.; WINNICKA, K. Stability of chitosan - A challenge for pharmaceutical and biomedical applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p. 1819-1846, 2015.

TAKMA, D. K.; KOREL, F. Active packaging films as a carrier of black cumin essential oil: Development and effect on quality and shelf-life of chicken breast meat. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 19, p. 210-217, 2019.

UMARAW, P.; VERMA, A. Comprehensive review on application of edible film on meat and meat products: An eco-friendly approach. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 6, p. 1270-1279, 2017.

YINGYUAD, S.; RUAMSIN, S.; REEKPRKHON, D.; DOUGLAS, S.; PONGAMPHAI, S.; SIRIPATRAWAN, U. Effect of chitosan coating and vacuum packaging on the quality of refrigerated grilled pork. *Packaging Technology Science*, v. 19, p. 149-157, 2006.

ZHANG, H.; YUN, S.; SONG, L.; ZHANG, Y.; ZHAO, Y. The preparation and characterization of chitin and chitosan under large-scale submerged fermentation level using shrimp by-products as substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 334-339, 2017.

ZULO, R.; IANNACE, S. The effects of different starch sources and plasticizers on film blowing of thermoplastic starch: Correlation among process, elongational properties and macromolecular structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 376-383, 2009.

**CAPÍTULO IV**  
**CONCLUSÃO GERAL**



#### 4 CONCLUSÃO GERAL

A associação do processo biotecnológico ao químico para a obtenção de quitina e quitosana foi considerada uma boa alternativa, pois removeu elevados níveis de proteína e minerais (88,31% e 91,38%), contribuindo para a produção final de quitosana com menor geração de resíduos, quando comparados ao método convencionalmente empregado no Brasil. A quitosana produzida apresentou características atraentes como grau de desacetilação de 80,17% e massa molar de 192 kDa, que são parâmetros importantes para a aplicação desse polímero, visto que influenciam nas propriedades biológicas e tecnológicas, como é o caso da excelente atividade antimicrobiana também verificada neste estudo (18,6 mm frente a *S. aureus*). Em vista disso, a quitosana destaca-se para a aplicação nas indústrias de alimentos como conservante natural ou empregada como embalagem ativa de alimentos através da elaboração de filmes.

Os filmes desenvolvidos à base de quitosana, de maneira geral, apresentaram-se contínuos, flexíveis e manuseáveis. O aumento na concentração de quitosana resultou em filmes mais amarelados, com maior capacidade de retenção de água e solubilidade, porém mais resistentes. Os filmes na maior concentração 2% (m/v) apresentaram boa estabilidade térmica e atividade antimicrobiana frente ao micro-organismo *S. aureus*, sendo escolhidos como melhor tratamento para a aplicação em filés de peito de frango. Entretanto, devido à elevada permeabilidade ao vapor de água, tornaram os filés mais escuros e mais enrijecidos. Os filmes de quitosana diminuíram ou controlaram a multiplicação dos micro-organismos e retardaram a oxidação lipídica nos filés.

Em vista disso, pode-se concluir que os filmes de quitosana, produzida a partir dos subprodutos do caranguejo vermelho por processo misto, demonstram potencial para aplicação em produtos cárneos, prolongando a vida útil dos filés de peito de frango do tipo *Sassami*.



## **CAPÍTULO V**

### **SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTUROS**



## **5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Produzir quitosana por processo biotecnológico, avaliando a influência nas propriedades e funcionalidades do polímero, e eliminando o uso de solventes.

Desenvolver filmes à base de quitosana incorporando lipídios para reduzir a permeabilidade ao vapor de água, ampliando a aplicação em alimentos com elevado conteúdo de água.



## **CAPÍTULO VI**

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAM, B. B.; HEGGSET, E. B.; NORBER, A. L.; SORLIE, M.; VARUM, K. M.; EIJSINK, V. G. Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. **Marine Drugs**, v. 27, n. 5, p. 1482-1517, 2010.

ABDOU, E. S.; GALHOUM, G. F.; MOHAMED, E. N. Curcumin loaded nanoemulsion/pectin coating for refrigerated chicken fillets. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 445-453, 2018.

ABDULKARIM, A.; ISA, M. T.; ABDULSALAM, S.; MUHAMMAD, A. J.; AMEH, A. O. Extraction and characterization of chitin and chitosan from Mussel shell. **Civil and Environmental Research**, v. 3, n. 2, p. 108-114, 2013.

ADLER-NISSEN, J. **Enzymatic hydrolysis of food proteins**. London: Elsevier Applied Science Publishing, 1986. 283 p.

AGUILAR, J. G. S.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2018.

AGUIRRE-LOREDO, R. Y.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A. I.; MORALES-SÁNCHEZ, E.; GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; VELAZQUEZ, G. Effect of equilibrium moisture content on barrier, mechanical and thermal properties of chitosan films. **Food Chemistry**, v. 196, p. 560-566, 2016.

AHMED, S.; IKRAM, S. **Chitosan derivatives, composites and applications**. Berverly: Scrivener Publishing, 2017. 503 p.

ALCANTARA, M.; MORAIS, I. C. L.; SOUZA, C. M.; CORRÊA, O. C. Principais microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v. 6, n. 1, p. 1-20, 2012.

ALVARADO, S.; SANDOVAL, G.; PALOS, I.; TELLEZ, S.; AGUIRRE-LOREDO, Y.; VELAZQUEZ, G. The effect of relative humidity on tensile strength and water vapor permeability in chitosan, fish gelatin and transglutaminase edible films. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 690-695, 2015.

ANAND, M.; KALAIVANI, R.; MARUTHUPANDY, M.; KUMARAGURU, A. K.; SURESH, S. Extraction and characterization of chitosan from marine crab and squilla collected from the Gulf of Mannar Region, South India. **Journal of Chitin and Chitosan Science**, v. 2, p. 1-8, 2014.

ANTONINO, R. S. C. M. Q.; FOOK, B. R. P. L.; LIMA, V. A. O.; RACHED, R. I. F.; LIMA, E. P. N.; LIMA, R. J. S.; COVAS, C. A. P.; FOOK, M. V. L. Preparation and characterization of chitosan obtained from shells of shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). **Marine Drugs**, v. 15, n. 5, p. 141-150, 2017.

ANTUNES-VALCAREGGI, S. A.; FERREIRA, S. R.S; HENSE, H. Enzymatic hydrolysis of Blue Crab (*Callinectes Sapidus*) waste processing to obtain chitin, protein, and astaxanthin-

enriched extract. **International Journal of Environmental & Agriculture Research**, v. 3, p. 81-92, 2017.

AOAC. **Official methods of analysis**. 17 ed. Maryland: Association off Official Analytical Chemistry, 2000.

ARANCIBIA, M. Y.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Chitosan coatings enriched with active shrimp waste for shrimp preservation. **Food Control**, v. 54, p. 259–266, 2015.

ARANDAY-GARCÍA, R.; GUERRERO, A. R.; IFUKU, S.; SHIRAI, K. Sucessive inoculation of *Lactobacillus brevis* and *Rhizopus oligosporus* on shrimp wastes for recovery of chitin and added-value products. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 17-24, 2017.

ARANKU, M.; GEBICKI, J. M.; IOHARA, D.; TOMIDA, H.; UEKAMA, K.; MARUYAMA, T.; HIRAYAMA, F.; OTAGIRI, M. Antioxidant activities of chitosans and its derivatives in *in vitro* and *in vivo* studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, p. 141-149, 2018.

ARBIA, W.; ARBIA, L.; ADOUR, L.; AMRANE, A. Chitin extraction from crustacean shells using biological methods - A review. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 12-25, 2013.

ASSIS, O. B. G. Change in hydrophilic characteristics of chitosan films by hmnds plasma treatment. **Química Nova**, v. 33, n. 3, 2010.

ASTM. Standard guide for characterization and testing of chitosan salts as starting materials intended for use in biomedical and tissue engineered. **In: Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials, Designation F2103-11**, West Conshohocken: ASTM International 2011.

ASTM. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. **In: Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials, Designation D882-12**, West Conshohocken: ASTM International 2012.

ASTM. E96-00 Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. **In: Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials, Designation E96-00**, West Conshohocken: ASTM International 2012.

AVILA-SOSA, R.; PALOU, E.; MUNGUÍA, M. T. J.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V.; CRUZ, A. R. N.; LÓPEZ-MALO, A. Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 66-72, 2012.

AZADBAKHT, E.; MAGAHSOUDLOU, Y.; KHOMIRI, M.; KASHIRI, M. Development and structural chacterization of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil: Potential as an antimicrobial carrier for packaging of sliced sausage. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 17, p. 65-72, 2018.

AZUMA, K.; NISHIHARA, M.; SHIMIZU, H.; ITOH, Y.; TAKASHIMA, O.; OSAKI, T.; ITOH, N.; IMAGAWA, T.; MURAHATA, Y.; TSUKA, T.; IZAWA, H.; IFUKU, S.; MINAMI, S.; SAIMOTO, H.; OKAMOTO, Y.; MORIMOTO, M. Biological adhesive based on carboxymethyl chitin derivatives and chitin nanofibers. **Biomaterials**, v. 42, p. 20-29, 2015.

BAUTISTA, J.; JOVER, M.; GUTIERREZ, J.F.; CORPAS, R.; CREMADES, O.; FONTIVEROS, E.; IGLESIAS, F.; VEGA, J. Preparation of crayfish chitin by *in situ* lactic acid production. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 229-234, 2001.

BAZARGANI-GILANI, B.; ALIAKBARLU, J.; TAJIK, H. Effect of pomegranate juice dipping and chitosan coating enriched with *Zataria multiflora* Boiss essential oil on the shelf-life of chicken meat during refrigerated storage. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 29, p. 280-287, 2015.

BENHABILES, M. S.; SALAH, R.; DROUCHE, N.; GOOSEN, M. F. A.; MAMERI, N. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 1, p. 48-56, 2012.

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD-ARNAUD, T. M.; ALCÂNTARA, S. R. C.; SILVA, A. C.; SILVA, A. M.; NASCIMENTO, A. E.; CAMPOSTAKAKI, G. M. Green conversion of agroindustrial wastes into chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* strains. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 9082-9102, 2014.

BOBELMANN, F.; ROMANO, P.; FABRITIUS, H.; RAABE, D.; EPPLE, M. The composition of the exoskeleton of two crustacea: The American lobster *Homarus americanus* and the edible crab *Cancer pagurus*. **Termochimica Acta**, v. 463, p. 65-68, 2007.

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

BRASIL. Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 26 dez. de 1998. Seção 1, p. 225-226.

BRASIL. Instrução Normativa nº 23, de 04 de dezembro de 2008. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 dez. 2008. Seção 1, p. 101-102.

BRYKSA, B.C.; YADA, R. Y. Bioquímica de alimentos. In: CAMPBELL-PLATT, G. (Ed.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Manole, 2015. 507 p.

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E. T.; CAPRIOLI, L. Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. **Journal of Food Science**, v. 66, p. 865-870, 2001.

CAHÚ, T. B.; SANTOS, S. D.; MENDES, A.; CÓRDULA, C. R.; CHAVANTE, S. F.; CARVALHO JR., L. B.; NADER, H. B.; BEZERRA, R. S. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 570-577, 2012.

CAI, J.; YANG, J.; DU, Y.; FAN, L.; QIU, Y.; LI, J.; KENNEDY, J.F. Enzymatic preparation of chitosan from the waste *Aspergillus niger* mycelium of citric acid production plant. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 151–157, 2006.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de alfa e beta-quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.

CARDOSO, G.P. **Revestimentos comestíveis à base de gelatina, glicerina, quitosana e óleos essenciais para conservação de carne bovina refrigerada**. 2014. 220 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

CASTRO, R.; GUERRERO-LEGARRETA, I.; BÓRQUEZ, R. Chitin extraction from *Allopetrolisthes punctatus* crab using lactic fermentation. **Biotechnology Reports**, v. 20, p. 112-118, 2019.

CESTARI, A.R.; VIEIRA, E.F.S.; TAVARES, A.M.G.; BRUNS, R.E. The removal of the indigo carmine dye from aqueous solutions using cross-linked chitosan: Evaluation of adsorption thermodynamics using a full factorial design. **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, p. 566-574, 2008.

CHEN, P. Y.; LIN, A. Y. M., MCKITTRICK, J.; MEYERS, M. A. Structure and mechanical properties of crab exoskeletons. **Acta Biomater**, v. 4, p 587-596, 2008.

CHO, Y.; HAN, S.; YAN, X.; KO, S. PVA containing chito-oligosaccharide side chain. **Polymer**, v. 41, n. 6, p. 2033-2039, 2000.

CIE. **Colorimetry**. 2 ed. Wien: Commission International de l'Éclairage, 1986.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test**. 13 ed. Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute, 2018. 92 p.

CORTEZ-VEGA, W. R.; PIZATO, S.; PRENTICE, C. Quality of raw chicken breast stored at 5 °C and packaged under different modified atmospheres. **Journal of Food Safety**, v. 32, n. 3, 2012.

CRACKEL, 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.

DAVIE, P.; TURKAY, M. **Geryonidae Colosi (1923), 2009**. [S.I.]: World Register of Deep-Sea species. Disponível em: <http://www.marinespecies.org/Deepsea/aphia.php?p=taxdetails&id=106762>. Acesso em: 07 de jan. 2019, 15:07:02.

DAVIE, P.; TURKAY, M. **Chaceon Manning & Holthuis (1989), 2016**. [S.I.]: World Register of Deep-Sea species. Disponível em: <http://www.marinespecies.org/Deepsea/aphia.php?p=taxdetails&id=106917>. Acesso em: 07 de jan. 2019, 15:10:28.

- DEGIRMENCIOGLU, N.; ESMER, O. K.; IRKIN, R.; DEGIRMENCIOGLU, A. Effects of vacuum and modified atmosphere packaging on shelf life extension of minced meat chemical and microbiological changes. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, n. 7, p. 898-911, 2012.
- DOBROVOL'SKAYA, I. P.; KASATIN, I. A.; YUDIN, V. E.; IVAN'KOVA, E. M.; ELOKHOVSKII, V. Y. Supramolecular structure of chitin nanofibrils. **Polymer Science Series A**, v. 57, n. 1, p. 52-57, 2015.
- DOMÍNGUEZ, R.; BARBA, F. J.; GÓMEZ, B.; PUTNIK, P.; KOVACEVIC, D. B.; PATEIRO, M.; SANTOS, E. M.; LORENZO, J. M. Active packaging films with natural antioxidants to be used in meat industry: A review. **Food Research International**, v. 113, p. 93-101, 2018.
- DUAN, J.; CHERIAN, G.; ZHAO, Y. Quality enhancement in fresh and frozen lingcod (*Ophiodon elongates*) fillets by employment of fish oil incorporated chitosan coatings. **Food Chemistry**, v. 119, p. 524-532, 2010.
- DUAN, S.; LI, L.; ZHUANG, Z.; WU, W.; HONG, S.; ZHOU, J. Improved production of chitin from shrimp waste by fermentation with epiphytic lactic acid bacteria. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1283-1288, 2012.
- DUN, Y.; LI, Y.; XU, J.; HU, Y.; ZHANG, C.; LIANG, Y.; ZHAO, S. Simultaneous fermentation and hydrolysis to extract chitin from crayfish shell waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 420-426, 2019.
- DUTTA, P. K.; DUTTA, J.; TRIPATHI, V. S. Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 63, p. 20-31, 2004.
- ECONOMOU, V.; ZISIDES, N.; GOUSIA, P.; PETSIOS, S.; SAKKAS, H.; SOULTOS, N.; PAPADOPOULOU, C. Prevalence and antimicrobial profile of *Campylobacter* isolates from free-range and conventional farming chicken meat during a 6-year survey. **Food Control**, v. 56, p. 161-168, 2015.
- EL HALAL, S. L. M.; COLUSSI, R.; DEON, V. G.; PINTO, V. Z.; VILLANOVA, F. A.; CARREÑO, N. L. V.; DA ROSA ZAVAREZE, E. Films based on oxidized starch and cellulose from barley. **Carbohydrate polymers**, v. 133, p. 644-653, 2015.
- ELIEH-ALI-KOMI, D.; HAMBLIN, M. R. Chitin and chitosan: Production and application of versatile biomedical nanomaterials. **International Journal of Advanced Research**, v. 4, n. 3, p. 411-427, 2016.
- ELSABEE, M. Z.; ABDU, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering**, v. 33, n. 4, p. 1819-1841, 2013.
- ESCÁRCEGA-GALAZ, A. A.; SÁNCHEZ-MACHADO, D. I.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; SANCHES-SILVA, A.; MADERA-SANTARA, T. J.; PASEIRO-LOSADA, P. Characterization data of chitosan-based films: Antimicrobial activity, thermal analysis, elementary composition, tensile strength and degree crystallinity. **Data in Brief**, v. 21, p. 473-479, 2018.

FALGUERA, V.; QUINTERO, J. P.; JIMÉNEZ, A.; MUÑOZ, J. A.; IBARZ, A. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, n. 6, p. 292–303, 2011.

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

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and challenges**. Rome: [s.n], 2014. 243 p.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture: Contributing to food security and nutrition for all**. Rome: [s.n], 2016. 204 p.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. Meeting the sustainable development goals..** Rome: [s.n], 2018. 277 p.

FELIPE, L. O.; RABELLO, L. A.; JUNIOR, E. N.; SANTOS, I. J. Quitosana: da química básica à bioengenharia. **Química Nova Escolar**, v. 39, n. 4, p. 312-320, 2017.

FERNÁNDEZ-PAN, I.; CARRIÓN-GRANDE, X.; MATÉ, J. I. Antimicrobial efficiency of edible coating on the preservation of chicken breast fillet. **Food Control**, v. 36, p. 69-75, 2014.

FERREIRA, A. S.; NUNES, C.; CASTRO, A.; FERREIRA, P.; COIMBRA, M. A. Influence of grape pomace extract incorporation on chitosan films properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 490–499, 2014.

FRANCISCO, C. F.; SIMORA, R. M. C.; NUÑAL, S. N. Deproteinization and demineralization of shrimp waste using lactic acid bacteria for the production of crude chitin and chitosan. **International Journal of the Bioflux Society**, v. 8, p. 107-115, 2015.

FRANCO; B. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

FUNDO, J. F.; CARVALHO, A.; FEIO, G.; SILVA, C. L. M.; QUINTAS, M. A. C. Relationship between molecular mobility, microstructure and functional properties in chitosan/glycerol films. **Innovative Food & Emerging Technologies**, v. 28, p. 81-85, 2015.

GAMAL, R. F.; EL-TAYEB, T. S.; RAFFAT, E. I.; IBRAHIM, H. M. M.; BASHANDY, A. S. Optimization of chitin yield from shrimp shell waste by *Bacillus subtilis* and impact of gamma irradiation on production of low molecular weight chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 598-608, 2016.

GITERU, S. G.; OEY, I.; ALI, M. A.; JOHSON, S. K.; FANG, Z. Effect of kafirin-based films incorporating citral and quercetin on storage of fresh chicken fillets. **Food Control**, v. 80, p. 37-44, 2017.

GOMES, L. P.; OLIVEIRA, C. I. R.; SILVA, M. C.; ANDRADE, C. T.; AGUILA, E. M.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. Purificação e caracterização da quitinase de uva (*Vitis*

*vinífera* L. CV RED GLOBE) para a produção de quitosana a partir de quitina de camarão. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1882-1886, 2010.

GÓMEZ-ESTACA, J.; CALVO, M. M.; ÁLVAREZ-ACERO, I.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Characterization and storage stability of astaxanthin esters, fatty acid profile and -tocopherol of lipid extract from shrimp (*L. vannamei*) waste with potential applications as food ingredient. **Food Chemistry**, v. 216, p. 37-44, 2017.

GONÇALVES, A. A. (Org.) **Tecnologia do pescado: Ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: Atheneu, 2011. 608 p.

GORTARI, M. C.; HOURS, R. A. Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: A mini-review. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 1-14, 2013.

GOY, R. C.; MORAIS, S. T. B.; ASSIS, O. B. G.; DUARTE, L. M. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n.1, p. 122-127, 2016.

HAFSA, J.; SMACH, M. A.; KHEDHER, M. R. B.; CHARFEDDINE, B.; LIMEM, K.; MAJDOUB, H.; ROUATBI, S. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. **LWT – Food Science and Technology**, v. 68, p. 356-364, 2016.

HALABALOVA, V.; SIMEK, L. MOKREJS, P. Intrinsic viscosity and conformational parameters of chitosan chains. **Rasayan Journal of Chemistry**, v. 4, p. 223-241, 2011.

HAMDI, M.; HAJJI, S.; AFFES, S.; TAKTAK, W.; MAÂLEJ, H.; NASRI, M.; NASRI, R. Development of a controlled bioconversion process for the recovery of chitosan from blue crab (*Portunus segnis*) exoskeleton. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 534-548, 2018.

HAMDI, M.; NASRI, R.; LI, S.; NASRI, M. Bioactive composite films with chitosan and carotenoproteins extract from blue crab shells: Biological potential and structural, thermal, and mechanical characterization. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 802-812, 2019.

HAMED, I.; ÖZOGUL, F.; REGENSTEIN, J. M. Industrial applications of crustacen by-products (chitin, chitosan and chitooligosaccharides): A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 40-50, 2016.

HAN, J. H.; KROCHTA, J. M. Water vapor permeability and wetting properties of whey protein coating on paper. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, v. 42, p. 1375-1382, 1999.

HASSANZADEH, P.; TAJIK, H.; ROHANI, S. M. R.; MORADI, M.; HASHEMI, M.; ALIAKBARLU, J. Effect of functional chitosan coating and gamma irradiation on the shelf-life of chicken meat during refrigerated storage. **Radition Physic and Chemistry**, v. 141, p. 103-109, 2017.

HIGUERAS, L.; LÓPEZ-CARBALLO, G.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; CATALÁ, R.; GAVARA, R. Antimicrobial packaging of chicken fillets based on the release of carvacrol

from chitosan/cyclodextrin films. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 53-59, 2014.

HOLANDA, H. D.; NETTO, F. M. Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, p. 298-303, 2006.

HOMEZ-JARA, A.; DAZA, L. D.; AGUIRRE, D. M.; MUÑOZ, J. A.; SOLANILLA, J. F.; VÁQUIRO, H. A. Characterization of chitosan edible films obtained with various polymer concentrations and drying temperatures. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1233-1240, 2018.

HU, Z. Y.; WANG, P. P.; FU, E. G.; WANG, X. J.; YAN, X. Q.; XU, P.; WU, Z. M.; ZHAO, Y. B.; LIANG, Y. X. Bilayer nanoporous copper films with various morphology features synthesized by one-step dealloying. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 754, p. 26-31, 2018.

IAHNKE, A. O. S.; COSTA, T. M. H.; RIOS, A. O.; FLÔRES, S. H. Residues of minimally processed carrot and gelatin capsules: Potential materials for packaging films. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 1071–1078, 2016.

JAY, J. M.; LOESNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7 ed. New York: Chapman and Hall, 2005. 319 p.

JO, G. H.; JUNG, W. J.; KUK, J. H.; OH, K. T.; KIM, Y. J.; PARK, R.D. Screening of protease-producing *Serratia marcescens* FS-3 and its application to deproteinization of crab shell waste for chitin extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 504-508, 2008.

KASAAI, M. Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 801-810, 2010.

KAUR, S.; DHILLON, G. S. Recent trends in biological extraction of chitin from marine shell wastes: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 44–61, 2015.

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

KHALID, K. An overview of lactic acid bacteria. **International Journal of Biosciences**, v. 1, n. 3, p. 1-13, 2011.

KHOUSHAB, F.; YAMABHAI, M. Chitin research revisited. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1988-2012, 2010.

KIMURA, V. T.; MIYASATO, C. S.; GENESI, B. P.; LOPES, P. S.; YOSHIDA, C. M. P.; SILVA, C. F. The effect of andiroba oil and chitosan concentration on the physical properties of chitosan emulsion film. **Polímeros**, v. 26, n. 2, p. 168-174, 2016.

KITTUR, F. S.; PRASHANTH, H.; SANKAR, K. U.; THARANATHAN, R. N. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 2, p. 185-193, 2002.

KNIDRI, H. E.; BELAABED, R.; ADDAOU, A.; LAAJEB, A.; LAHSINI, A. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1191-1189, 2018.

KONG, M.; CHEN, X. G.; LIU, C. S.; LIU, C. G.; MENG, X. H.; YU, L. J. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 65, n. 2, p. 197-202, 2008.

KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51-63, 2010.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 43-81, 2000.

KROCHTA, J.M.; BALDWIN, E. A.; NISPEROS-CARRIEDO, M. O. **Edible coating and films to improve food quality**. Lancaster: Technomic Pub Co., 1994. 394 p.

KUMAR B.; SMITA K., CUMBAL L.; DEBUT A. Synthesis of silver nanoparticles using sachu inchi (*Plukenetia volubilis L.*) leaf extracts. **Saudi Journal of Biological Science**, v. 21, p. 605-609, 2014.

KUMIRSKA, J.; CZERWICKA, M.; KACZYNSKI, Z.; BYCHOWSKA, A.; BRZOZOWSKI, K.; THOMING, J.; STEPNOWSKI, P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. **Marine Drugs**, v. 8, n. 5, 2010.

LAGE-YUSTY, M.; VILASOA-MARTÍNEZ, M.; ÁLVAREZ-PÉREZ, S.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J. Chemical composition of snow crab shells (*Chionoecetes opilio*). **CyTA - Journal of Food**, v. 9, n. 4, p. 265-270, 2011.

LATORRES, J. M.; RIOS, D. G.; SAGGIOMO, G.; WASIELESKY, W. Jr.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Functional and antioxidant properties of protein hydrolysates obtained from White shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 721-729, 2018.

LATOU, E.; MEXIS, S. F.; BADEKA, A.V.; KOTANKOS, S.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of chitosan and modified atmosphere packaging for shelf life extension of chicken breast fillets. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 263-268, 2014.

LEKJING, S. A chitosan-based coating with or without clove oil extends the shelf life of cooked pork sausages in refrigerated storage. **Meat Science**, v. 111, p. 192-197, 2016.

LIMA, M. M.; CARNEIRO, L. C.; BIANCHINI, D.; DIAS, A. R.; ZAVAREZE, E. D.; PRENTICE, C.; MOREIRA, A. D. Structural, Thermal, Physical, Mechanical, and Barrier Properties of Chitosan Films with the Addition of Xanthan Gum. **Journal of Food Science**, v. 82, n.3, p. 698-705, 2017.

LISKOVÁ, J.; DOUGLAS, T. E. L.; BERANOVÁ, J.; SKWARCZYNSKA, A.; BOZIC, M.; SAMAL, S. K.; MODRZEJEWSKA, Z.; GORGIEVA, S.; KOKOL, V.; BACAKOVÁ, L.

Chitosan hydrogels enriched with polyphenols: Antibacterial activity, cell adhesion and growth and mineralization. **Carbohydrate Polymers**, v. 129, p. 135-142, 2014.

LIU, Y.; LIU, Y.; LIAO, N.; CUI, F.; PARK, M.; KIM, H. Fabrication and durable antibacterial properties of electrospun chitosan nanofibers with silver nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 638-643, 2015.

LOPES, C.; ANTELO, L. T.; FRANCO-URÍA, A.; ALONSO, A. A.; PÉREZ-MARTÍN, R. Chitin production from crustacean biomass: Sustainability assessment of chemical and enzymatic processes. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 4140-4151, 2018.

MAO, X.; ZHANG, J.; KAN, F.; GAO, Y.; LAN, J.; ZHANG, X.; HU, Z.; LI, Y.; LIN, H. Antioxidant production and chitin recovery from shrimp head fermentation with *Streptococcus thermophilus*. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 1023-1032, 2013.

MEI, J.; YAUN, Y.; WU, Y.; LI, Y. Characterization of edible starch-chitosan film and its application in the storage of Mongolian cheese. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 57, p. 17-21, 2013.

MEZAROBA, M. E. P. C. **Avaliação da vida útil de filés de frango resfriados, embalados a vácuo e em atmosfera modificada, sob armazenamento isotérmico e não isotérmico**. 2014. 133 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MEZZOMO, N. **Extração e encapsulamento de compostos com importância tecnológica e biológica proveniente do resíduo de processamento de camarão**. 2012. 216 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MILKOVA, V.; RADEVA, T. Influence of charge density and calcium salt on stiffness of polysaccharides multilayer film. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 481, p. 13-19, 2015.

MOHAMMED, M. H.; WILLIAMS, P. A.; TVEREZOVSKAYA, O. Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan. **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 2, p. 166-171, 2013.

MORAN, H. B. T.; TURLEY, J. L.; ANDERSSON, M.; LAVELLE, E. C. Immunomodulatory properties of chitosan polymers. **Biomaterials**, v. 184, p. 1-19, 2018.

MORGANTI, P.; MORGANTI, G.; MORGANTI, A. Transforming nanostructured chitin from crustacean waste into beneficial health products: a must for our society. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 4, p. 123-127, 2011.

MORENO, O.; ATARÉS, L.; CHIRALT, A.; CRUZ-ROMERO, M. C.; KERRY, J. Starch-gelatin antimicrobial packaging materials to extend the shelf life of chicken breast fillets. **LWT, - Food Science and Technology** v. 97, p. 483-490, 2018.

- MOURA, C.; MUSZINSKI, P.; SCHMIDT, C.; ALMEIDA, J.; PINTO, L. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: Avaliação do processo em escala piloto. **Vetor**, v. 16, n. 1-2, p. 37-45, 2006.
- MOURA, J. M.; FARIAS, B. S.; RODRIGUES, D. A. S.; MOURA, C. M.; DOTTO, G. L.; PINTO, L. A. A. Preparation of chitosan with different characteristics and its application for biofilms production. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 23, p. 470-477, 2015.
- MOUSSOUT, H.; AHLAFI, H.; AAZZA, M.; BOURAKHOUDAR, M. Kinetic and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis. **Polymer Degradation and Stability**, v. 130, p. 1-9, 2016.
- MOUSAVI KHANEGHAH, A.; HASHEMI, S. M. B.; LIMBO, S. Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. **Food and Bioproducts Processing**, v. 111, p 1-19, 2018.
- MUJTABA, M.; MORSI, R. E.; KERCH, G.; ELSABEE, M. Z.; KAYA, M.; LABIDI, J.; KHAWAR, K. M. Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 889-904, 2019.
- MULLA, M.; AHMED, J.; AL-ATTAR, H.; CASTRO-AGUIRRE, E.; ARFAT, Y.; AURAS, R. Antimicrobial efficacy of clove essential oil infused into chemically modified LLDPE film for chicken meat packaging. **Food Control**, v. 73, p 663-671, 2017.
- MURAKAMI, K.; AOKI, H.; NAKAMURA, S.; NAKAMURA, S.; TAKIKAWA, M.; HANZAWA, M.; KISHIMOTO, S.; HATTORI, H.; TANAKA, Y.; KIYOSAWA, T.; SATO, Y.; ISHIHARA, M. Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. **Biomaterials**, v. 31, p. 83-90, 2010.
- NOORI, S.; ZEYNALI, F.; ALMASI, H. Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. **Food Control**, v. 84, p. 312-320, 2018.
- OLIVO, R. **O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango**. Criciúma: [s.n], 2006.
- ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: [s.n], 2012. 552 p.
- ÖZOGUL, F.; HAMED, I.; ÖZOGUL, Y.; REGENSTEIN, J. M. Crustacean by-products. **Reference Module in Food Science**, v. 10, p. 1-7, 2018.
- PACHECO, N.; GARNICA-GONZÁLEZ, M.; GIMENO, M.; BÁRZANA, E.; TROMBOTTO, S.; DAVID, L.; SHIRAI, K. Structural characterization of chitin and chitosan obtained by biological and chemical methods. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 9, p. 3285-3290, 2011.

PALERMO, E. F.; KURODA, K. Structural determinants of antimicrobial activity in polymers which mimic host defense peptides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 1605-1615, 2010.

PANARIELLO, L.; COLTELLI, M.; BUCHIGNANI, M.; LAZZERI, A. Chitosan and nano-structured chitin for biobased anti-microbial treatments onto cellulose based materials. **European Polymer Journal**, v. 113, p. 328-339, 2019.

PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; KNILL, C. J.; KOSSEVA, M. Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from Whey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 219-226, 2010.

PASTOR, C.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHIRALT, A.; CHAFÉR, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Physical and antioxidant properties of chitosan and methycellulose based films containing resveratrol. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 272-280, 2013.

PELCZAR JR; M.J., CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações 2** ed. São Paulo: MAKRON Books, 1996. 524 p.

PEREDA, M.; PONCE, A. G.; MARCOVICH, N. E.; RUSECKAITE, R. A.; MARTUCII, J. F. Chitosan-gelation composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1372-1381, 2011.

PEREDA, M.; DUFRESNE, A.; ARANGUREN, M. I.; MARCOVICH, N. E. Polyelectrolyte films based on chitosan/olive oil and reinforced with cellulose nanocrystals. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1018-1026, 2014.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 7, p. 641-678, 2009.

PINHEIRO, M.; BOOS, H. (Org.) **Livro vermelho dos crustáceos do Brasil: Avaliação 2010-2014**. 1. ed. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Carcinologia - SBC, 2016. 466 p.

PIRES, C.; MARQUES, A.; CARVALHO, M. L.; BATISTA, I. Chemical characterization of *Cancer pagurus*, *Maja squinado*, *Necora puber* and *Carcinus maenas* shells. **Poultry, Fisheries & Wildlife Sciences**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2017.

PINTO, M. F.; PONSANO, E. H. G.; ALMEIDA, A. P. S. Espessura da lâmina de cisalhamento na avaliação instrumental da textura da carne. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1405-1410, 2010.

POLA, C. C.; MEDEIROS, E. A. A.; PEREIRO, O. L.; SOUZA, V. G. L.; OTONI, C. G.; CAMILLOTO, G. P.; SOARES, N. F. F. Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fung. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 9, p. 69-78, 2016.

POSHINA, D. N.; RAIK, S. V.; POSHIN, A. N.; SKORIK, Y. A. Accessibility of chitin and chitosan in enzymatic hydrolysis: A review. **Polymer Degradation and Stability**, v. 156, p. 269-278, 2018.

PRABU, K.; NATARAJAN, E. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of chitosan isolated from *Podophthalmus vigil*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 9, p. 75-82, 2012.

PRAMEELA, K.; MURALI MOHAN, C.; SMITHA, P. V.; HEMALATHA, K. P. J. Bioremediation of shrimp biowaste by using natural probiotic for chitin and carotenoid production an alternative method to hazardous chemical method. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v. 1, n. 3, p. 903-910, 2011.

PRIYADARSKI, R.; NEGI, Y. S. Effect of varying filler concentration on Zinc Oxide nanoparticle embedded chitosan films as potential food packaging material. **Journal of Polymers and The Environment**, v. 25, n. 4, p. 1087-1098, 2017.

PRIYADARSHI, R.; SAURAJ, S.; KUMAR, B.; NEGI, Y. S. Chitosan film incorporated with citric acid and glycerol as an active packaging material for extension of green chilli shelf life. **Carbohydrate Polymers**, v. 195, p. 329-338, 2018.

QUEIROZ, M. F.; MELO, K. R. T.; SABRY, D. A.; SASSAKI, G. L.; ROCHA, H. A. O. Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation? **Marine Drugs**, v. 13, p. 141-158, 2015.

RAEISI, M.; TABARAEI, A.; HASHEMI, M.; BENHAMPOUR, N. Effect of sodium alginate coating incorporated with nisin, *Cinnamomum zeylanicum*, and rosemary essential oils on microbial quality of chicken meat and fate of *Listeria monocytogenes* during refrigeration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 139-145, 2016.

RAMÍREZ, M. A.; RODRIGUEZ, A. T.; ALFONSO, C. P. Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. **Biotecnologia Aplicada**, v. 27, p. 270-276, 2010.

RAO, M. S.; MUÑOZ, J.; STEVENS, W. F. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 6, p. 808-813, 2000.

RAWLINGS, N. D.; WALLER, M.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. *MEROPS*: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 503-509, 2014.

RHIM, J.; PARK, H.; HA, C. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10-11, p. 1629-1652, 2013.

RIAZ, A.; LEI, S.; AKHTAR, H. M. S.; WAN, P.; CHEN, D.; JABBAR, S.; ABID, M.; HASHIM, M. M.; ZENG, X. Preparation and characterization of chitosan-based antimicrobial active food packaging film incorporated with apple peel polyphenols. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 547-555, 2018.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and application. **Progress Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.

- RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. ARACHCHI, J. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 531-539, 2009.
- ROCHA, M.; LOIKO, M. R.; TONDO, E. C.; PRENTICE, C. Physical, mechanical and antimicrobial properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein films incorporated with organic acids. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 213-230, 2014.
- ROCHA, M.; CARDOZO, M. A.; RAFFI, J. E.; HALAL, S. L. M.; SOUZA, M. M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Functional, thermal and physicochemical properties of proteins from Argentine croaker (*Umbrina canosai*) recovered by solubilization/precipitation or a washing process. **International Food Research Journal**, v. 24, p. 579-588, 2017.
- ROCHA, M.; ALEMAN, A.; BACCAN, G. C.; LOPEZ-CABALLERO, M. E.; GOMEZ-GUILLEN, M. C.; MONTERO, P.; PRENTICE, C. Anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial effects of underutilized fish protein hydrolysate. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 27, p. 592-608, 2018.
- ROMANI, V. P.; PRENTICE, C.; MARTINS, V. G. Pink pepper phenolic compounds incorporation in starch/protein blends and its potential to inhibit apple browning. **Food packaging and shelf life**, v. 15, p. 151-158, 2018.
- ROMANI, V. P.; OLSEN, B. D.; COLLARES, M.; OLIVEIRA, J. R. M.; PRENTICE, C.; MARTINS, V. G. Improvement of fish protein films properties for food packaging through glow discharge plasma application. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 970-976, 2019.
- ROY, J. C.; SALAUN, F.; GIRAUD, S.; FERRI, A.; CHEN, G.; GUAN, J. Solubility of chitin: Solvents, solution behaviors and their related mechanisms. **Solubility Polysaccharides**, v. 10, p. 109-127, 2017.
- SAGHEER, F. A. A.; AL-SUGHAYER, M. A.; MUSLIM, S.; ELSABEE, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 410-419, 2009.
- SANT'ANA, R.; PEZZUTO, P.R. Sexual maturity of the deep-sea red crab *Chaceon notialis* Manning & Holthuis, 1989 (Brachyura: *Geryonidae*) in southern Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 37, p. 429-442, 2009.
- SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; ALVES, R. V.; OLIVEIRA, L. M.; GOMES, T. C. **Embalagens com atmosfera modificada**. Campinas: CETEA/ITAL, 1996. 114 p.
- SAYARI, N.; SILA, A.; ABDELMALEK, B. E.; ABDALLAH, R. B.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; BOUGATEF, A.; BALTI, R. Chitin and chitosan from the Norway lobster by-products: Antimicrobial and anti-proliferative activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 163-171, 2016.
- SEBTI, I.; COMA, V. Active edible polysaccharide coating and interactions between solution coating compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 2, p. 139-144, 2002.

SEDAGHATI, M.; EZZATPANAH, H.; BOOJAR, M. M. A.; EBRAHIMI, M. T.; KOBARFARD, F. Isolation and identification of some antibacterial peptides in the plasmin-digest of beta-casein. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 217-225, 2016.

SEDAGHAT, F.; YOUSEFZADI, M.; TOISERKANI, H.; NAJAFIPOUR, S. Bioconversion of shrimp waste *Penaeus merguensis* using lactic acid fermentation an alternative procedure for chemical extraction of chitin and chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 883-888, 2017.

SHOJAEI-ALIABADI, S.; HOSSEINI, H.; MOHAMMADIFAR, M. A.; MOHAMMADI, A.; GHASEMLOU, M.; OJAGH, S. M.; HOSSEINI, S. M.; KHAKSAR, R. Characterization of antioxidant-antimicrobial k-carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, p. 116-124, 2013.

SIGNINI, R.; CAMPANA-FILHO, S. P. On the preparation and characterization of chitosan hydrochloride. **Polymer Bulletin**, v. 42, n. 2, p. 159-166, 1998.

SILALAH, J.; SITUMORANG, P.; PATILAYA, P.; SILALAH, Y. C. Antibacterial activity of chitosan and hydrolyzed coconut oil and their combination against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 9, n. 5, p. 127-129, 2016.

SINHA, S.; CHAND, S.; TRIPATHI, P. Microbial degradation of chitin waste for production of chitosanase and food related bioactive compounds. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 50, p. 125-133, 2014.

SIRIPATRAWAN, U.; VITTHAYAKITTI, W. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 695-702, 2016.

SIRIPATRAWAN, U.; KAEWKLIN, P. Fabrication and characterization of chitosan-titanium dioxide nanocomposite film as ethylene scavenging and antimicrobial active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 84, p. 125-134, 2018.

SIVASHANKARI, P. R.; PRABAHARAN, M. Deacetylation modification techniques of chitin and chitosan. **Chitosan Based Biomaterials**, v. 1, p. 117-133, 2017.

SOBRAL, P. J. A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 6, p. 1251-1259, 2000.

SOGUT, E.; SEYDIM, A. C. The effects of chitosan and grape seed extract-based edible films on the quality of vacuum packaged chicken breast fillets. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 18, p. 13-20, 2018.

SOGUT, E.; SEYDIM, A. C. The effects of chitosan and polycaprolactone-based bilayer films incorporated with grape seed extract and nanocellulose on the quality of chicken breast fillets. **LWT - Food Science and Technology**, v. 101, p. 799-805, 2019.

SOLOMONS, T. W. G.; FRIHLE, C. B. **Química Orgânica**. 9. ed., Rio de Janeiro: LTC, 2009. 494 p.

SOTHORNVIT, R.; KROCHT, J. M. Plasticizers in edible films and coating. **Innovations in Food Packaging**, v. 24, p. 403-433, 2005.

SOUZA, C. O.; SILVA, L. T.; DRUZIAN, J. I. Estudo comparativo da caracterização de filmes biodegradáveis de amido de mandioca contendo polpas de manga e de acerola. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 262-267, 2012.

SOUZA, S. O.; D'ERRICO, F.; AZIMI, B., BALDASSARE, A.; ALVES, A. V. S.; VALENÇA, J. V. B.; BARROS, V. S. M.; CASCONI, M. G. CASCONI; LAZZERI, L. OSL films for in-vivo entrance dose measurements. **Radiation Measurements**, v. 106, p. 644-649, 2017.

SOYSAL, Ç.; BOZKURT, H.; DIRICAN, E.; GUÇLU, M.; BOZHUYUK, E. D.; USLU, A. E.; KAYA, S. Effect of antimicrobial packaging on physicochemical and microbial quality of chicken drumsticks. **Food Control**, v. 54, p. 294-299, 2015.

STRATAKOS, A. C.; DELGADO-PANDO, G.; LINTON, M.; PATTERSON, M. F.; KOIDIS, P. A. Synergism between high-pressure processing and active packaging against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat chicken breast. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 27, p. 41-47, 2015.

SU, J.; HUANG, Z.; ZHAO, Y.; YUAN, X.; WANG, X.; LI, M. Moisture sorption and water vapor permeability of soy protein isolate/poly(vinylalcohol)/glycerol blend films. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 2, p. 266-276, 2010.

SUGJYANTI, D.; DARMADJI, P.; SANTOSO, U.; PRANOTO, Y.; ANWAR, C.; ANGGRAHINI, S. Biological activity of native and low molecular weight chitosan obtained by Steam Explosion Process. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 9, p. 441-447, 2018.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. A. Q. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. **Food Chemistry**, v. 68, n. 2, p. 147-152, 2000.

SZYMÁŃSKA, E.; WINNICKA, K. Stability of chitosan - A challenge for pharmaceutical and biomedical applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p. 1819-1846, 2015.

TAKMA, D. K.; KOREL, F. Active packaging films as a carrier of black cumin essential oil: Development and effect on quality and shelf-life of chicken breast meat. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 19, p. 210-217, 2019.

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

TOAN, N. V.; HANH, T. T. Application of chitosan solutions for rice production in Vietnam. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 382-384, 2013.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura – **Relatório anual 2016**. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/>. Acesso em: 17 jan. 2019, 20:15:09.

UMARAW, P.; VERMA, A. Comprehensive review on application of edible film on meat and meat products: An eco-friendly approach. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 6, p. 1270-1279, 2017.

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas. **Tabela brasileira de composição de alimentos. Campinas 2011**. Disponível em: [http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco\\_versao2.pdf](http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_versao2.pdf). Acesso em: 17 jan. 2019, 20:30:13.

VAITHIYANATHA, S.; NAVVENA, B. M.; MUTHUKUMAR, M.; GIRISH, P. S.; KONDAIAH, N. Effect of dipping in pomegranate (*Punica granatum*) fruit juice phenolic solution on the shelf life of chicken meat under refrigerated storage (4 °C). **Meat Science**, v. 88, p. 409-414, 2011.

VALDEZ-PEÑA, A. U.; ESPINOZA-PÉREZ, J. D.; SANDOVAL-FABIAN, G. C.; BALAGURUSAMY, N.; HERNÁNDEZ-RIVERA, A.; DE-LA GARZA-RODRÍGUEZ, I. M.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C. Screening of industrial enzymes for deproteinization of shrimp head for chitin recovery. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 553-557, 2010.

VAN DER ELST, R. P.; EVERETT, B. (Ed.) **Offshore fisheries of the Southwest Indian Ocean: their status and the impact on vulnerable species**. Durban: South African Association for Marine Biological Research - Oceanographic Research Institute, 2015. 452 p.

VAN DYKEN, S. J.; LOCKSLEY, R. M. Chitins and chitinase activity in airway diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 142, n. 2, p. 364-369, 2018.

VÁZQUEZ, J. A.; NORIEGA, D.; RAMOS, P.; VALCARCEL, J.; NOVOA-CARBALLAL, R.; PASTRAN, L.; REIS, R. L.; PÉREZ-MARTÍN, R. I. Optimization of high purity chitin and chitosan production from *Illex argentinus* pens by a combination of enzymatic and chemical processes. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 262-272, 2017.

VIDAWATIA, S.; SITTERBERGC, J.; ROTHEB, U.; BAKOWSKYC, U. Stability of monomolecular films of archaeobacterial tetraether lipids on silicon wafers: A comparison of physisorbed and chemisorbed monolayers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.87, p. 209–216, 2011.

VIEIRA, M. G. A.; DA SILVA, M. A.; DOS SANTOS, L. O.; BEPPU, M. M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 3, p. 254–263, 2011.

VILLAMIL; O.; VÁQUIRO, H.; SOLANILLA, J. F. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and biactive properties. **Food Chemistry**, v. 224, p. 160-171, 2017.

VINSOVA, J.; VAVRIKOVA, E. Recent advances in drugs and prodrugs design of chitosan. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 13, p. 1311-1326, 2008.

- WU, H.; WILLIAMS, G. R.; WU, J.; WU, J.; NIU, S.; LI, H.; WANG, H.; ZHU, L. Regenerated chitin fibers reinforced with bacterial cellulose nanocrystals as suture biomaterials. **Carbohydrate Polymers**, v. 180, p. 304-313, 2018.
- YAN, N.; CHEN, X. Don't waste seafood waste. **Nature**, v. 524, p. 155-157, 2015.
- YEN, M.; YANG, J.; MAU, J. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 15-21, 2009.
- YINGYUAD, S.; RUAMSIN, S.; REEKPRKHON, D.; DOUGLAS, S.; PONGAMPHAI, S.; SIRIPATRAWAN, U. Effect of chitosan coating and vacuum packaging on the quality of refrigerated grilled pork. **Packaging Technology Science**, v. 19, p. 149-157, 2006.
- YOUNES, I.; GHORBEL-BELLAJ, O.; NASRI, R.; CHAABOUNI, M.; RINAUDO, M.; NASRI, M. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2032-2039, 2012.
- YOUNES, I.; HAJJI, S.; FRACHET, V.; RINAUDO, M.; JELLOULI, K.; NASRI, M. Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 489-498, 2014.
- YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133-1174, 2015.
- ZHANG, H.; NEAU, S. H. *In vitro* degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: Effect of molecular weight and degree of deacetylation. **Biomaterials**, v. 22, p. 1653-1658, 2001.
- ZHANG, H.; JIN, Y.; DENG, Y.; WANG, D.; ZHAO, Y. Production of chitin from shrimp shell powders using *Serratia marcescens* B742 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 successive two-step fermentation. **Carbohydrate Research**, v. 362, p. 13-20, 2012.
- ZHANG, H.; YUN, S.; SONG, L.; ZHANG, Y.; ZHAO, Y. The preparation and characterization of chitin and chitosan under large-scale submerged fermentation level using shrimp by-products as substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 334-339, 2017.
- ZHONG, Z.; XING, R.; LIU, S.; WANG, L.; CAI, S.; LI, P. The antioxidant activity of 2-(4(or2)-hydroxyl-5-chloride-1,3-benzene-di-sulfanimide)-chitosan. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 10, p. 2171-2177, 2008.
- ZOHURIAAN, M. J.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing**, v. 23, p. 575-579, 2004.
- ZOU, P.; YANG, X.; WANG, J.; LI, Y.; YU, H.; ZHANG, Y.; LIU, G. Advances in characterization and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 190, p. 1174-1181, 2016.

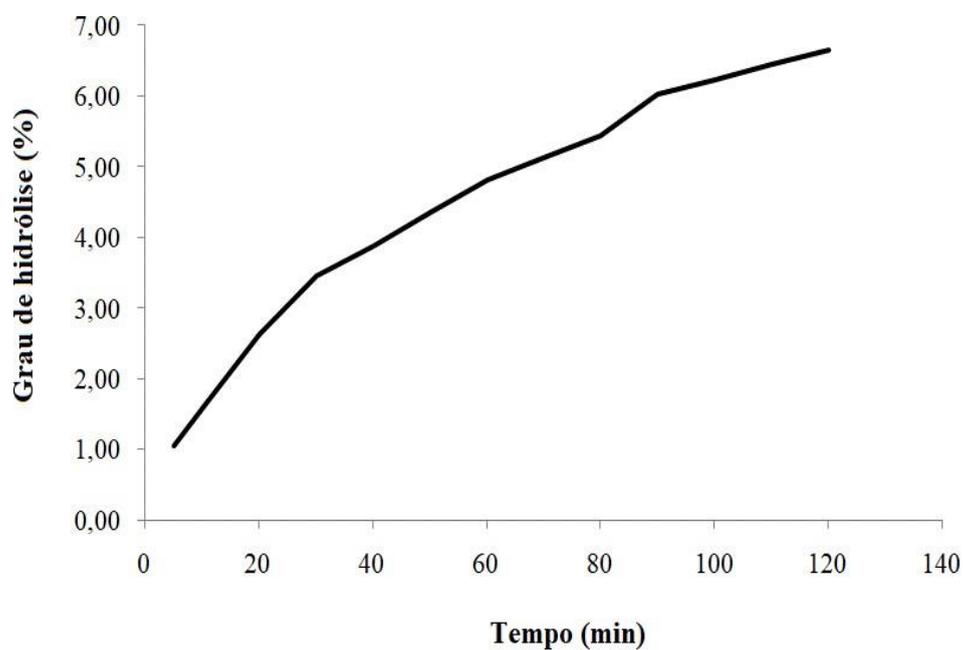
ZULO, R.; IANNACE, S. The effects of different starch sources and plasticizers on film blowing of thermoplastic starch: Correlation among process, elongational properties and macromolecular structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 376-383, 2009.



## APÊNDICE I

## TESTE COM ENZIMA PROTAMEX PARA DESPROTEINIZAÇÃO

**Figura 1** – Cinética da hidrólise enzimática para a desproteínização dos exoesqueletos de caranguejo vermelho com enzima Protamex



Grau de hidrólise em 120 min de reação: 6,66%

Eficiência de remoção das proteínas: 56,85%



## APÊNDICE II

### TESTES PRELIMINARES PARA O DESENVOLVIMENTO DOS FILMES

Foi realizada a avaliação subjetiva dos filmes verificando-se as características: continuidade (ausência de rupturas ou fraturas após a secagem), homogeneidade (ausência de partículas insolúveis ou bolhas visíveis ao olho nu) e manuseabilidade (possibilidade de ser manuseado sem riscos de ruptura).

**Tabela 1** – Avaliação subjetiva dos filmes

<b>Filmes</b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>M</b>
1	+++	++	+++
2	+++	++	+++
3	++	+	++
5	+	+	+

C: Continuidade. H: Homogeneidade. M: Manuseabilidade. 1: Filmes de quitosana na concentração 1% (m/v); 2: Filmes de quitosana na concentração 2% (m/v); 3: Filmes de quitosana na concentração 3% (m/v); 5: Filmes de quitosana na concentração 5% (m/v); +++: excelente; ++: boa; +: deficiente.



### APÊNDICE III

**Tabela 1** – Análise estatística da determinação de pH

Tempo (dias)	T1	T2	T3	T4
0	5,84 ± 0,12 <sup>eA</sup>	5,84 ± 0,12 <sup>cA</sup>	5,84 ± 0,12 <sup>dA</sup>	5,84 ± 0,12 <sup>cA</sup>
3	5,95 ± 0,15 <sup>DA</sup>	5,87 ± 0,13 <sup>aC</sup>	5,90 ± 0,10 <sup>cB</sup>	5,90 ± 0,06 <sup>bB</sup>
5	6,03 ± 0,09 <sup>cA</sup>	5,85 ± 0,12 <sup>bD</sup>	5,93 ± 0,02 <sup>bC</sup>	5,95 ± 0,10 <sup>aB</sup>
7	6,21 ± 0,10 <sup>bA</sup>	5,85 ± 0,11 <sup>bC</sup>	5,94 ± 0,04 <sup>aB</sup>	5,75 ± 0,12 <sup>dD</sup>
10	6,64 ± 0,07 <sup>aA</sup>	5,84 ± 0,06 <sup>cC</sup>	5,94 ± 0,11 <sup>aB</sup>	5,70 ± 0,12 <sup>eD</sup>

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) ao longo do tempo do armazenamento para o mesmo tratamento; Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para as diferentes condições de embalagem no mesmo tempo de armazenamento.

**Tabela 2** – Análise estatística da determinação de textura

Tempo (dias)	T1	T2	T3	T4
0	42,25 ± 0,14 <sup>aA</sup>	42,25 ± 0,14 <sup>eA</sup>	42,25 ± 0,14 <sup>bA</sup>	42,25 ± 0,14 <sup>aA</sup>
3	36,71 ± 0,17 <sup>bD</sup>	43,54 ± 0,12 <sup>dA</sup>	42,78 ± 0,10 <sup>aB</sup>	37,43 ± 0,10 <sup>bC</sup>
5	27,92 ± 0,06 <sup>cC</sup>	49,91 ± 0,14 <sup>cA</sup>	36,13 ± 0,10 <sup>cB</sup>	24,13 ± 0,11 <sup>cD</sup>
7	23,36 ± 0,12 <sup>dC</sup>	50,15 ± 0,10 <sup>bA</sup>	31,04 ± 0,11 <sup>dB</sup>	21,59 ± 0,12 <sup>dD</sup>
10	21,22 ± 0,04 <sup>eC</sup>	69,73 ± 0,11 <sup>aA</sup>	28,79 ± 0,13 <sup>eB</sup>	19,70 ± 0,15 <sup>eD</sup>

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) ao longo do tempo do armazenamento para o mesmo tratamento; Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para as diferentes condições de embalagem no mesmo tempo de armazenamento.

**Tabela 3** – Análise estatística da determinação de estabilidade lipídica (TBARS)

Tempo (dias)	T1	T2	T3	T4
0	0,24 ± 0,10 <sup>eA</sup>			
3	0,59 ± 0,12 <sup>dB</sup>	0,46 ± 0,16 <sup>dD</sup>	0,55 ± 0,10 <sup>dC</sup>	0,63 ± 0,10 <sup>dA</sup>
5	1,56 ± 0,16 <sup>cC</sup>	1,09 ± 0,13 <sup>cD</sup>	1,59 ± 0,11 <sup>cB</sup>	1,79 ± 0,11 <sup>cA</sup>
7	2,63 ± 0,11 <sup>bA</sup>	1,93 ± 0,13 <sup>bD</sup>	2,24 ± 0,11 <sup>bC</sup>	2,43 ± 0,12 <sup>bB</sup>
10	3,70 ± 0,14 <sup>aA</sup>	2,14 ± 0,12 <sup>aD</sup>	2,35 ± 0,11 <sup>aC</sup>	3,17 ± 0,13 <sup>aB</sup>

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) ao longo do tempo do armazenamento para o mesmo tratamento; Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para as diferentes condições de embalagem no mesmo tempo de armazenamento.

**Tabela 4** – Análise estatística da determinação de perda de massa

Tempo (dias)	T1	T2	T3	T4
0	-	-	-	-
3	1,16 ± 0,02 <sup>dD</sup>	13,75 ± 0,05 <sup>dA</sup>	1,72 ± 0,01 <sup>dC</sup>	1,76 ± 0,02 <sup>dB</sup>
5	1,37 ± 0,03 <sup>cD</sup>	19,18 ± 0,05 <sup>cA</sup>	1,84 ± 0,01 <sup>cC</sup>	1,98 ± 0,02 <sup>cB</sup>
7	1,39 ± 0,01 <sup>Bd</sup>	27,11 ± 0,03 <sup>bA</sup>	2,00 ± 0,01 <sup>bC</sup>	2,11 ± 0,02 <sup>bB</sup>
10	1,45 ± 0,04 <sup>aD</sup>	38,14 ± 0,01 <sup>aA</sup>	2,29 ± 0,01 <sup>aB</sup>	2,27 ± 0,05 <sup>aC</sup>

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) ao longo do tempo do armazenamento para o mesmo tratamento; Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para as diferentes condições de embalagem no mesmo tempo de armazenamento.

**Tabela 5** – Análise estatística da contagem de Enterobactérias (Log UFC/g)

Tempo (dias)	T1	T2	T3	T4
0	1,44 ± 0,12 <sup>eA</sup>			
3	2,69 ± 0,17 <sup>dA</sup>	2,23 ± 0,23 <sup>cC</sup>	2,19 ± 0,10 <sup>dD</sup>	2,64 ± 0,06 <sup>dB</sup>
5	2,90 ± 0,04 <sup>cA</sup>	2,20 ± 0,14 <sup>dD</sup>	2,38 ± 0,02 <sup>cC</sup>	2,74 ± 0,01 <sup>cB</sup>
7	3,04 ± 0,12 <sup>bA</sup>	2,27 ± 0,10 <sup>bD</sup>	2,50 ± 0,04 <sup>bC</sup>	2,79 ± 0,12 <sup>bB</sup>
10	4,12 ± 0,01 <sup>aA</sup>	2,39 ± 0,09 <sup>aD</sup>	2,54 ± 0,13 <sup>aC</sup>	2,83 ± 0,15 <sup>aB</sup>

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) ao longo do tempo do armazenamento para o mesmo tratamento; Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para as diferentes condições de embalagem no mesmo tempo de armazenamento.

**Tabela 6** – Análise estatística da contagem de Bactérias ácido lácticas (Log UFC/g)

Tempo (dias)	T1	T2	T3	T4
0	2,00 ± 0,15 <sup>eA</sup>	2,00 ± 0,15 <sup>aA</sup>	2,00 ± 0,15 <sup>eA</sup>	2,00 ± 0,15 <sup>eA</sup>
3	2,44 ± 0,12 <sup>dA</sup>	1,77 ± 0,17 <sup>bD</sup>	2,14 ± 0,10 <sup>dC</sup>	2,27 ± 0,15 <sup>dB</sup>
5	2,64 ± 0,10 <sup>cA</sup>	1,69 ± 0,15 <sup>cD</sup>	2,32 ± 0,12 <sup>cC</sup>	2,56 ± 0,10 <sup>cB</sup>
7	2,94 ± 0,06 <sup>bB</sup>	1,30 ± 0,04 <sup>dD</sup>	2,59 ± 0,01 <sup>bC</sup>	3,33 ± 0,05 <sup>bA</sup>
10	4,11 ± 0,04 <sup>aB</sup>	1,00 ± 0,12 <sup>eD</sup>	2,94 ± 0,06 <sup>aC</sup>	5,32 ± 0,09 <sup>aA</sup>

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) ao longo do tempo do armazenamento para o mesmo tratamento; Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para as diferentes condições de embalagem no mesmo tempo de armazenamento.

**Tabela 7** – Análise estatística da contagem de Mesófilos aeróbios totais (Log UFC/g)

Tempo (dias)	T1	T2	T3	T4
0	2,90 ± 0,10 <sup>eA</sup>	2,90 ± 0,10 <sup>aA</sup>	2,90 ± 0,10 <sup>bA</sup>	2,90 ± 0,10 <sup>dA</sup>
3	4,07 ± 0,13 <sup>dA</sup>	1,93 ± 0,15 <sup>Ed</sup>	2,39 ± 0,12 <sup>eC</sup>	2,94 ± 0,06 <sup>eB</sup>
5	4,30 ± 0,09 <sup>ca</sup>	2,05 ± 0,06 <sup>dD</sup>	2,77 ± 0,13 <sup>dC</sup>	3,09 ± 0,15 <sup>cB</sup>
7	5,27 ± 0,01 <sup>bA</sup>	2,12 ± 0,03 <sup>cD</sup>	2,84 ± 0,03 <sup>cC</sup>	3,99 ± 0,10 <sup>bB</sup>
10	5,31 ± 0,16 <sup>aA</sup>	2,25 ± 0,10 <sup>bD</sup>	3,79 ± 0,04 <sup>aC</sup>	4,17 ± 0,07 <sup>aB</sup>

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) ao longo do tempo do armazenamento para o mesmo tratamento; Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para as diferentes condições de embalagem no mesmo tempo de armazenamento.

**Tabela 8** – Análise estatística da contagem de *Pseudomonas* spp. (Log UFC/g)

Tempo (dias)	T1	T2	T3	T4
0	3,73 ± 0,05 <sup>eA</sup>	3,73 ± 0,05 <sup>aA</sup>	3,73 ± 0,05 <sup>aA</sup>	3,73 ± 0,05 <sup>ca</sup>
3	4,10 ± 0,10 <sup>dA</sup>	2,95 ± 0,07 <sup>bD</sup>	3,46 ± 0,06 <sup>bB</sup>	3,27 ± 0,10 <sup>eC</sup>
5	7,10 ± 0,08 <sup>ca</sup>	2,60 ± 0,04 <sup>cD</sup>	3,32 ± 0,03 <sup>cC</sup>	3,47 ± 0,12 <sup>dB</sup>
7	7,32 ± 0,10 <sup>bA</sup>	2,47 ± 0,11 <sup>dD</sup>	3,26 ± 0,03 <sup>dC</sup>	4,29 ± 0,09 <sup>bB</sup>
10	7,37 ± 0,14 <sup>aA</sup>	2,05 ± 0,01 <sup>eD</sup>	2,47 ± 0,06 <sup>eC</sup>	4,37 ± 0,19 <sup>aB</sup>

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) ao longo do tempo do armazenamento para o mesmo tratamento; Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para as diferentes condições de embalagem no mesmo tempo de armazenamento.

**Tabela 9** – Análise estatística da contagem de Psicrotrofos (Log UFC/g)

Tempo (dias)	T1	T2	T3	T4
0	ND	ND	ND	ND
3	2,55 ± 0,01 <sup>dA</sup>	1,03 ± 0,03 <sup>dD</sup>	1,99 ± 0,05 <sup>dC</sup>	2,14 ± 0,03 <sup>dB</sup>
5	3,80 ± 0,10 <sup>ca</sup>	2,39 ± 0,01 <sup>cD</sup>	2,56 ± 0,02 <sup>cC</sup>	3,77 ± 0,07 <sup>cB</sup>
7	3,95 ± 0,14 <sup>bA</sup>	2,89 ± 0,04 <sup>bD</sup>	3,11 ± 0,03 <sup>bC</sup>	3,92 ± 0,11 <sup>bB</sup>
10	4,38 ± 0,09 <sup>aA</sup>	3,28 ± 0,08 <sup>aD</sup>	3,99 ± 0,10 <sup>aC</sup>	4,17 ± 0,14 <sup>aB</sup>

ND: Não detectável. Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) ao longo do tempo do armazenamento para o mesmo tratamento; Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para as diferentes condições de embalagem no mesmo tempo de armazenamento.