



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

JOICE TEIXEIRA SOUZA

**POTENCIAL DE REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS À BASE DE QUITOSANA E
EXTRATO DE PRÓPOLIS NA CONSERVAÇÃO DO CAMARÃO BRANCO DO
PACÍFICO (*Litopenaeus vannamei*)**

MOSSORÓ

2021

JOICE TEIXEIRA SOUZA

**POTENCIAL DE REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS À BASE DE QUITOSANA E
EXTRATO DE PRÓPOLIS NA CONSERVAÇÃO DO CAMARÃO BRANCO DO
PACÍFICO (*Litopenaeus vannamei*)**

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Ciência Animal do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.

Linha de Pesquisa: Produção e Conservação
Animal no Semiárido.

Orientador: Prof^a. Dra. Patrícia de Oliveira
Lima.

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Henrique de
Lima Leite.

MOSSORÓ

2021

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

S
719p Souza, Joice Teixeira.
Potencial de revestimentos comestíveis à base de quitosana e extrato de própolis na conservação do camarão branco do pacífico (*Litopenaeus vannamei*) / Joice Teixeira Souza. - 2021.
90 f. : il.

Orientadora: Patrícia de Oliveira Lima .
Coorientadora: Ricardo Henrique de Lima Leite .
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, 2021.

1. Biopolímero. 2. Conservante natural. 3. Pescado. 4. Qualidade do pescado. I. , Patrícia de Oliveira Lima, orient. II. , Ricardo Henrique de Lima Leite, co-orient. III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

JOICE TEIXEIRA SOUZA

**POTENCIAL DE REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS À BASE DE QUITOSANA E
EXTRATO DE PRÓPOLIS NA CONSERVAÇÃO DO CAMARÃO BRANCO DO
PACÍFICO (*Litopenaeus vannamei*)**

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Ciência Animal do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.

Linha de Pesquisa: Produção e Conservação
Animal no Semiárido.

Defendida em: 26 / 02 / 2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª. Dra. Patrícia de Oliveira Lima (UFERSA)
Presidente

RICARDO HENRIQUE DE LIMA
LEITE:52264343400

Assinado de forma digital por
RICARDO HENRIQUE DE LIMA
LEITE:52264343400
Dados: 2021.02.26 08:53:03 -03'00'

Prof. Dr. Ricardo Henrique de Lima Leite (UFERSA)
Membro Examinador



Prof.ª. Dra. Maria Rociene Abrantes (UFERSA)
Membro Examinador

Aos meus pais, José Teixeira e Sandra
Maria, pelo apoio e incentivo
incondicional.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Parte desse trabalho foi desenvolvido em meio a pandemia do Covid-19, foram dias difíceis, o mundo parou, as atividades presenciais nas universidades foram suspensas, laboratórios fecharam, tivemos que nos isolar, muitas vidas se foram, tivemos medo, as coisas não puderam acontecer conforme o planejado, nos frustramos mas aprendemos muito. Com esse trabalho aprendi mais sobre companheirismo, empatia, sobre caminhar junto, sobre ser grata a todo momento e a confiar. Concluo esse ciclo porque como nos disse Saramago “o que tem de ser tem de ser e tem muita força” e assim foi, e por tudo de tanto, sou grata!

À Deus por me permitir viver essa experiência com saúde, calma e serenidade.

Aos meus pais pela dedicação a nossa família e por serem fundamentais em cada pequeno voo meu.

Ao meu irmão Samuel por me apoiar e por nos presentear com nosso solzinho, nossa Aurora.

Ao meu companheiro Felipe Rezende por partilhar a vida comigo, por respeitar minhas decisões e por cuidar de Serena enquanto estive fora.

Ao meu querido Vô Manoel e a minha tia irmã Gleice por todo carinho e apoio.

Aos amigos, Kewen Luz, Salenilda Firmino, Palloma Carlos, Érica Lorena e Gleydson de Freitas, as pessoas mais incríveis, generosas, companheiras e acolhedoras que conheci e tive a graça de conviver, aprender e partilhar.

À minha orientadora Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Lima por me receber em sua equipe, pela confiança, orientação e paciência.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Ricardo Henrique de Lima Leite pela disponibilidade e colaboração.

À Profa. Dra Maria Rociene e a Profa. Dra Edna Aroucha pela disponibilidade e palavras sinceras e certas de incentivo.

Aos técnicos de laboratório, Odonil Gomes, Tatiana Barbosa, Leonardo Gomes, Gustavo Lima e Carolina de Gouveia pela ajuda com as análises.

Aos queridos, Flávio Santana, Leônia Régia, Ana Michell, Marcos, Roosevelt, Ana Paula Pinheiro, Maria Izabel, Maria Érica e Tiago Mendes pelo apoio.

Ao meu amigo Maurício Donato por me apoiar, por caminhar junto comigo por tanto tempo sem cobranças e sem julgamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro tão importante e necessário.

POTENCIAL DE REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS À BASE DE QUITOSANA E EXTRATO DE PRÓPOLIS NA CONSERVAÇÃO DO CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO (*Litopenaeus vannamei*)

RESUMO

O escopo desse estudo foi obter e caracterizar filmes e revestimentos comestíveis à base de quitosana combinada com diferentes concentrações de extrato de própolis verde e vermelha e avaliar o potencial dos revestimentos na qualidade do camarão branco (*Litopenaeus vannamei*) resfriado e congelado. Os filmes produzidos com diferentes concentrações de extrato de própolis verde e vermelho (0,12%, 0,25%, 0,50%, 1,0% e 2,0%) foram caracterizados quanto suas propriedades ópticas: cor e opacidade; propriedades de barreira: permeabilidade ao vapor de água e solubilidade; propriedades mecânicas: resistência a tração, alongação na ruptura e módulo de elasticidade e microscopia eletrônica de varredura - MEV. A atividade antimicrobiana das soluções filmogênicas foi avaliada frente a cepas padrão de *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Para o experimento com camarão resfriado as amostras foram submetidas a diferentes tratamentos e divididos em cinco grupos: Controle (C); Metabissulfito (MBS); Quitosana (Q); Extrato de própolis verde (EPVD) e Quitosana + extrato de própolis verde (QEPVD), posteriormente, foi armazenado refrigerado a 4 ± 1 °C por 12 dias. Para o experimento com camarão congelado, o camarão foi processado e dividido em: Controle (C); Glaciado (G), Quitosana (Q); Quitosana + extrato de própolis verde (QEPVD) e quitosana + extrato de própolis vermelha (QEPVM) após a aplicação dos tratamentos foi armazenado congelado a - 18 °C por 180 dias. Para avaliar a qualidade do camarão resfriado e congelados, os grupos foram submetidos as análises físico-químicas: potencial hidrogeniônico – pH, reação as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS, perda de peso por cocção - PPC, capacidade de retenção de água – CRA, textura e cor instrumental, análises microbiológicas para determinação da presença de *Salmonella* spp. no tempo inicial, contagem de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, contagem total de psicrotróficas e de bactérias aeróbias mesófilas, no experimento com camarão resfriado foi realizada também a análise de Método Índice de Qualidade - MIQ. De acordo com os dados obtidos foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) nas propriedades de barreira e mecânicas dos filmes e melhores resultados foram encontrados nos filmes com concentrações de 0,12 e 0,25% de extrato de própolis verde e vermelha. A incorporação do extrato de própolis à quitosana proporcionou melhores resultados de atividade antimicrobiana frente à cepa de *E. coli*. A solução de revestimento de quitosana a 1,5% com 0,25% de extrato de própolis verde e quitosana 1,5% com 0,25% de extrato de própolis vermelha foram as escolhidas para continuação do estudo devido aos resultados positivos encontrados nas análises precedentes. No experimento com o camarão resfriado observou-se que as amostras de camarão revestidos com a combinação de quitosana e extrato de própolis demonstraram melhores resultados quanto aos valores de pH, TBARS, textura e inibição do desenvolvimento microbiano e da melanose. Já no experimento com o camarão congelado foi observado inibição do desenvolvimento de microrganismos, estabilidade oxidativa, manutenção do pH e melhores resultados na capacidade de retenção de água e manutenção do peso. A partir dos dados obtidos é possível inferir que houve sinergia entre a quitosana e o extrato de própolis e, portanto, essa combinação apresenta potencial como revestimento comestível e conservante natural para aumentar a qualidade sensorial e a vida útil do camarão branco.

Palavras-chave: Biopolímero, conservante natural, pescado, qualidade do pescado.

**POTENTIAL OF EDIBLE COATINGS BASED ON CHITOSAN AND PROPOLIS
EXTRACT IN THE CONSERVATION OF THE PACIFIC WHITE SHRIMP
(*Litopenaeus vannamei*)**

ABSTRACT

The scope of this study was to obtain and characterize edible films and coatings based on chitosan combined with different concentrations of green and red propolis extract and to evaluate the potential of the coatings on the quality of chilled and frozen white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The films produced with different concentrations of green and red propolis extract (0.12%, 0.25%, 0.50%, 1.0% and 2.0%) were characterized in terms of their optical properties: color and opacity; barrier properties: water vapor permeability and solubility; mechanical properties: tensile strength, elongation at break and modulus of elasticity and scanning electron microscopy - SEM. The antimicrobial activity of filmogenic solutions was evaluated against standard strains of *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. For the chilled shrimp experiment, the samples were subjected to different treatments and divided into five groups: Control (C); Metabisulfite (MBS); Chitosan (Q); Green propolis extract (EPVD) and Chitosan + green propolis extract (QEPVD), afterwards, it was stored refrigerated at 4 ± 1 °C for 12 days. For the frozen shrimp experiment, the shrimp was processed and divided into: Control (C); Glacier (G), Chitosan (Q); Chitosan + green propolis extract (QEPVD) and chitosan + red propolis extract (QEPVM) after application of the treatments was stored frozen at - 18 °C for 180 days. To assess the quality of chilled and frozen shrimp, the groups were subjected to physical-chemical analyzes: hydrogen potential - pH, reaction to substances reactive to thiobarbituric acid - TBARS, weight loss by cooking - PPC, water retention capacity - CRA , texture and instrumental color, microbiological analysis to determine the presence of *Salmonella spp.* in the initial time, count of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, total count of psychrotrophic and aerobic mesophilic bacteria, in the experiment with chilled shrimp the analysis of the Quality Index Method - MIQ was also performed. According to the data obtained, a significant difference ($p < 0.05$) was observed in the barrier and mechanical properties of the films and better results were found in films with concentrations of 0.12 and 0.25% of green and red propolis extract. The incorporation of the propolis extract to chitosan provided better results of antimicrobial activity against the *E. coli* strain. The 1.5% chitosan coating solution with 0.25% green propolis extract and 1.5% chitosan with 0.25% red propolis extract were chosen for the continuation of the study due to the positive results found in the previous analyzes. In the experiment with the chilled shrimp, it was observed that the shrimp samples coated with the combination of chitosan and propolis extract showed better results in terms of pH, TBARS, texture and inhibition of microbial and melanosis development. In the experiment with frozen shrimp, inhibition of the development of microorganisms was observed, oxidative stability, pH maintenance and better results in water retention capacity and weight maintenance. From the data obtained, it is possible to infer that there was a synergy between chitosan and the propolis extract and, therefore, this combination has potential as an edible coating and natural preservative to increase the sensory quality and useful life of white shrimp.

Keywords: Biopolymer, natural preservative, fish, fish quality.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II - REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS DE QUITOSANA COM INCORPORAÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA

- Figura 1.** Obtenção dos filmes pela técnica de *casting*.....41
- Figura 2.** Aparência visual de filmes obtidos a partir da incorporação de diferentes percentuais de extrato de própolis verde e vermelha à quitosana.....46
- Figura 3.** Dados da variável cor (parâmetros L^* a^* b^*) em revestimentos de quitosana incorporados com diferentes concentrações de extrato de própolis verde e própolis vermelha.....47
- Figura 4.** Dados das variáveis opacidade e espessura em revestimentos de quitosana incorporados com diferentes concentrações de extrato de própolis verde e própolis vermelha.....48
- Figura 5.** Micrografias da superfície e seção transversal de filmes de quitosana 1,5% incorporados com diferentes concentrações de extrato de própolis verde e própolis vermelha.....51

CAPÍTULO III - REVESTIMENTO DE QUITOSANA COMBINADO COM EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE NA QUALIDADE DO CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO RESFRIADO

- Figura 1.** Fluxograma do planejamento experimental.....62
- Figura 2.** Escores de A - Índice de Qualidade (IQ) e B - Índice de Melanose (IQ) do camarão branco (*L. vannamei*) durante 12 dias de armazenamento resfriado 4 ± 1 °C.....66

CAPÍTULO IV - REVESTIMENTO DE QUITOSANA COMBINADO COM EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE NA QUALIDADE DO CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO CONGELADO

- Figura 1.** Fluxograma do planejamento experimental.....81
- Figura 2.** Processo de aplicação do revestimento.....82
- Figura 3.** Contagem total de placas aeróbicas mesófilas de camarão (*L. vannamei*) congelado submetido a diferentes tratamentos durante 180 dias de armazenamento.....90

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II - REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS DE QUITOSANA COM INCORPORAÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA

- Tabela 1.** Teores médios de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante em extrato de própolis verde e extrato de própolis vermelha, Mossoró-RN, 2021.....45
- Tabela 2.** Dados das variáveis solubilidade e permeabilidade ao vapor de água (PVA) em revestimentos de quitosana incorporados com diferentes concentrações de extrato de própolis verde e própolis vermelha, Mossoró-RN, 2021.....49
- Tabela 3.** Dados das propriedades mecânicas de revestimentos de quitosana incorporados com diferentes concentrações de extrato de própolis verde e própolis vermelha, Mossoró-RN, 2021.....50
- Tabela 4.** Atividade antimicrobiana de extrato de própolis verde e vermelha e revestimentos de quitosana incorporados com diferentes concentrações de extrato de própolis verde e própolis vermelha, Mossoró-RN, 2021.....52

CAPÍTULO III - REVESTIMENTO DE QUITOSANA COMBINADO COM EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE NA QUALIDADE DO CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO RESFRIADO

- Tabela 1.** Esquema de MIQ utilizado para avaliar qualidade do camarão.....63
- Tabela 2.** Valores médios de pH e TBARS das amostras de camarão (*L. vannamei*) resfriado submetidas a diferentes tratamentos durante 9 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.....67
- Tabela 3.** Valores médios de CRA das amostras de camarão (*L. vannamei*) resfriado submetidas a diferentes tratamentos durante 9 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.....68
- Tabela 4.** Valores médios de PPC das amostras de camarão (*L. vannamei*) resfriado submetidas a diferentes tratamentos durante 9 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.....68
- Tabela 5.** Valores médios de textura das amostras de camarão (*L. vannamei*) resfriado submetidas a diferentes tratamentos durante 9 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.....69
- Tabela 6.** Valores médios de cor (L^* a^* b^*) das amostras de camarão (*L. vannamei*) resfriado submetidas a diferentes tratamentos durante 9 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.....70

Tabela 7.	Contagem total de placas aeróbicas mesófilas de camarão (<i>L. vannamei</i>) resfriado submetido a diferentes tratamentos durante 9 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.....	70
Tabela 8.	Pesquisa por <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i> spp. em camarão (<i>L. vannamei</i>) resfriado submetido a diferentes tratamentos durante 9 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.....	71

CAPÍTULO IV - REVESTIMENTO DE QUITOSANA COMBINADO COM EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE NA QUALIDADE DO CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO CONGELADO

Tabela 1.	Valores médios de pH e TBARS das amostras de camarão (<i>L. vannamei</i>) congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.....	85
Tabela 2.	Valores médios de umidade das amostras de camarão (<i>L. vannamei</i>) congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.....	86
Tabela 3.	Valores médios de capacidade de retenção de água - CRA das amostras de camarão (<i>L. vannamei</i>) congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.....	87
Tabela 4.	Valores médios de perda de peso por cocção - PPC das amostras de camarão (<i>L. vannamei</i>) congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.....	88
Tabela 5.	Valores médios de força de cisalhamento - FC das amostras de camarão (<i>L. vannamei</i>) congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.....	88
Tabela 6.	Valores médios de L* a* b* das amostras de camarão (<i>L. vannamei</i>) congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.....	89

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 Camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	18
3.2 Qualidade do pescado.....	18
3.3 Conservantes naturais.....	20
3.4 Revestimentos comestíveis	24
REFERÊNCIAS.....	26
CAPÍTULO II - REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS DE QUITOSANA COM INCORPORAÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA	34
RESUMO	35
ABSTRACT.....	36
1 INTRODUÇÃO	37
2 MATERIAL E MÉTODOS	38
2.1 Obtenção dos extratos de própolis.....	38
2.2 Caracterização dos extratos	39
2.3 Preparação das soluções filmogênicas e obtenção dos filmes.....	40
2.4 Caracterização dos filmes.....	41
2.5 Atividade antimicrobiana	42
2.6 Análise estatística	43
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1 Caracterização dos extratos de própolis	43
3.2 Caracterização dos revestimentos	44
4 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS.....	52
CAPÍTULO III - REVESTIMENTO DE QUITOSANA COMBINADO COM EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE NA QUALIDADE DO CAMARÃO <i>Litopenaeus vannamei</i> RESFRIADO	56
RESUMO	57
ABSTRACT.....	58
1 INTRODUÇÃO	59
2 MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1 Soluções de revestimento	60

2.2 Coleta e tratamento dos camarões	60
2.3 Método Índice de Qualidade - MIQ	61
2.4 Análises físico-químicas	62
2.5 Análises microbiológicas	64
2.6 Análise Estatística	64
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72
CAPÍTULO IV - REVESTIMENTO DE QUITOSANA COMBINADO COM EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE NA QUALIDADE DO CAMARÃO <i>Litopenaeus vannamei</i> CONGELADO	75
RESUMO	76
ABSTRACT	77
1 INTRODUÇÃO	78
2 MATERIAL E MÉTODOS	79
2.1 Soluções de revestimento	79
2.2 Coleta e tratamento dos camarões	79
2.4 Análises físico-químicas	81
2.5 Análises microbiológicas	83
2.6 Análise Estatística	83
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4 CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS	90

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A produção e o consumo de pescado no Brasil e no mundo vêm apresentando um crescimento expressivo ao longo dos últimos anos. Em dados recentes divulgados pela FAO (2020), a produção global de pescado em 2018 foi de 179 milhões de toneladas. Cerca de 88% desta produção foi destinada ao consumo humano, representando um crescimento de 1,5% ao ano em termos de consumo per capita, maior que qualquer outra proteína de origem animal (FAO, 2020).

Com alto valor agregado, características sensoriais e nutricionais bastante apreciadas, o camarão destaca-se como alimento nobre no mercado de alimentos de origem animal (YUAN *et al.*, 2016). Por outro lado, assim como outras espécies de pescado, o camarão é extremamente perecível e apresenta rápida deterioração devido à características intrínsecas (pH próximo à neutralidade, elevada atividade de água nos tecidos e alto teor de nutrientes) que favorecem a ação de microrganismos e processos enzimáticos. Um dos problemas mais comuns em sua cadeia produtiva é o desenvolvimento da melanose ou *black spots*, iniciado logo após a despesca é desencadeado por ação da enzima polifenoloxidase e minimizado com técnicas de conservação aliadas ao uso de aditivos sintéticos (sulfitos) (FURLAN, 2011).

As técnicas de conservação de alimentos são ancestrais. Povos antigos já conservavam seus alimentos de forma intuitiva ou empírica, utilizando o calor, o frio, o sal, ervas, condimentos e até mesmo o suco de frutas cítricas (EVANGELISTA, 1998). Essas técnicas foram sendo aprimoradas ao longo dos tempos com o auxílio da tecnologia de alimentos e do desenvolvimento de métodos, processos e novas tecnologias (NESPOLO, 2015).

Para garantir a qualidade, a segurança e manter as características nutricionais dos alimentos, são usadas técnicas de conservação por congelamento, refrigeração, processos térmicos, secagem, salga, embalagens ativas e outras. Também são utilizados conservantes sintéticos como agentes antioxidantes e antimicrobianos para conservar os alimentos e estender sua vida útil.

Nos últimos anos o uso de conservantes sintéticos em alimentos passou a ser questionado por pesquisadores e consumidores devido aos efeitos colaterais (DHIMAN *et al.*, 2016) e aos diversos estudos que apontam os efeitos tóxicos e até mesmo ação cancerígena e teratogênica relacionada ao seu uso e consumo em doses elevadas (YANG *et al.*, 2017; FALLEH *et al.*, 2019).

A partir de discussões acerca do uso indiscriminado dos conservantes sintéticos sob a ótica da segurança de alimentos e da mudança no comportamento alimentar humano

(GUNYAKTI e ASAN-OZUSAGLAM, 2018), pesquisadores de diversas áreas estão focando suas pesquisas no desenvolvimento de conservantes seguros, obtidos através de fontes naturais com potencial antioxidante e antimicrobiano que possam ser utilizados em alimentos como alternativa aos conservantes sintéticos já utilizados comercialmente (CLARKE *et al.*, 2017).

Diante da mudança no comportamento alimentar da população e da busca por alimentos mais saudáveis e mais próximos do natural, a quitosana e os extratos vegetais destacam-se por desempenhar atividade antimicrobiana e antioxidante sendo uma alternativa ao uso de conservantes sintéticos. Quando utilizados em conjunto com as técnicas tradicionais de conservação, representam uma opção eficiente na manutenção da qualidade e aumento da vida de prateleira de vários alimentos, através do retardo no desenvolvimento de microrganismos e da oxidação (PERDONES *et al.*, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Elaborar e avaliar o potencial de revestimentos comestíveis a base de quitosana e extrato de própolis na qualidade e conservação do camarão *Litopenaeus vannamei*.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter e caracterizar revestimentos e filmes comestíveis a base de quitosana e diferentes concentrações de extrato de própolis verde e vermelha;
- Avaliar as propriedades ópticas, de barreira e mecânicas dos filmes comestíveis de quitosana e extrato de própolis;
- Analisar a atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis;
- Analisar a influência dos revestimentos de quitosana e extrato de própolis, em relação às características físico-químicas e microbiológicas do camarão resfriado;
- Verificar a influência do extrato de própolis como agente antimelanótico em camarão resfriado;
- Analisar a influência dos revestimentos de quitosana e extrato de própolis, em relação às características físico-químicas e microbiológicas de camarão congelado.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Camarão *Litopenaeus vannamei*

Comumente conhecido como camarão branco do Pacífico ou camarão cinza, o *Litopenaeus vannamei* é uma espécie de camarão marinho com origem na Costa do Oceano Pacífico. Representa cerca de 80% da produção total de camarão no mundo sendo amplamente cultivado, comercializado e de grande importância econômica (JESCOVITCH *et al.*, 2018; OKPALA, 2014). No Brasil, sua importância econômica se dá especialmente para a região Nordeste onde a carcinicultura representa oportunidades de negócios e geração de emprego e renda para o semiárido.

O sucesso na produção do *L. vannamei* está relacionado à fácil adaptabilidade ao cultivo, rusticidade, tolerância a fatores como salinidade e temperatura e também aos pacotes tecnológicos desenvolvidos para a espécie (SANTOS, 2009). O alto valor de mercado se deve ao seu sabor característico bastante apreciado (YUAN *et al.*, 2016) que o coloca em destaque como pescado nobre. Dessa forma, grandes receitas são geradas para a cadeia produtiva (OKPALA, 2014).

Apesar do grande destaque, o camarão, assim como outras espécies de pescado, é uma proteína com alto grau de perecibilidade (ALOTAIBI; TAHERGORABI, 2018) devido a suas características intrínsecas, como elevada atividade de água, que favorece o desenvolvimento de microrganismos, e alterações químicas que, aliadas ao manuseio inadequado, podem causar depreciação e perdas (TSIRONI *et al.*, 2009; FARIA *et al.*, 2011; CASTRO; PAGANI, 2004).

3.2 Qualidade do pescado

A rápida deterioração do pescado está relacionada às seguintes características que favorecem o desenvolvimento microbiano: pH próximo à neutralidade, elevada atividade de água nos tecidos e alto teor de nutrientes (GONÇALVES, 2011). Esses fatores tornam o pescado altamente perecível e diminui sua vida de prateleira (DEHGHANI *et al.*, 2018). Dessa forma, é imprescindível a adoção de práticas de higiene em toda a cadeia produtiva e manutenção da cadeia de frio logo após a despesca e ao longo de todo processo de beneficiamento, transporte e armazenagem (SOUZA *et al.*, 2013).

Para determinar a qualidade do pescado são utilizados métodos microbiológicos, físico-químicos e/ou sensoriais. Bogdanovic *et al.* (2012), relatam que a avaliação sensorial é o

principal método para medir a qualidade do pescado sendo também o mais utilizado tanto por consumidores quanto pela indústria por ser uma análise rápida, objetiva e de fácil entendimento.

As técnicas tradicionais de conservação como refrigeração, congelamento, salga e secagem, permanecem sendo estudadas e aprimoradas para melhorar a qualidade e aumentar a vida útil do pescado (WANG *et al.*, 2018). No entanto, Arancibia *et al.* (2015), destacam que as técnicas tradicionais de conservação por si só não são capazes de manter com eficiência a qualidade do pescado.

Assim, novas tecnologias estão sendo desenvolvidas e aprimoradas, como, por exemplo, o uso de embalagens ativas. Nesse sentido, os revestimentos comestíveis a base de conservantes naturais podem representar uma excelente alternativa para minimizar com eficiência a deterioração do pescado e prolongar sua vida de prateleira (FARAJZADEH *et al.*, 2016), podendo ser aplicados em conjunto com técnicas tradicionais.

A melanose é um dos problemas mais específicos ligados à qualidade do camarão. Neste caso, ela está relacionada com a qualidade sensorial, uma vez que as manchas escuras tornam a aparência do camarão desagradável, causando a rejeição do produto pelo consumidor, desvalorização de mercado e perdas econômicas expressivas (YUAN *et al.*, 2016).

3.2.1 Melanose

Popularmente conhecido como melanose ou *black spot*, o processo de escurecimento enzimático em crustáceos se apresenta como manchas escuras insolúveis que surgem nas articulações, no exoesqueleto e partes lesionadas dos crustáceos logo após a despesca (GONÇALVES *et al.*, 2015). Esse pigmento escuro é produto de reações da enzima polifenoloxidase (OGAWA *et al.*, 1984; MARTÍNEZ-ALVAREZ *et al.*, 2005) que converte fenóis em quinonas que, por sua vez, após polimerização, dão origem ao pigmento preto (SENAPATI *et al.*, 2017).

O desenvolvimento da melanose está relacionado com fatores como espécie, manejo, despesca e captura. Já a intensidade com que se desenvolve depende da espécie (CINTRA *et al.*, 1999; GONÇALVES; OLIVEIRA 2016). Durante o congelamento ou resfriamento as enzimas responsáveis pela melanose são inativadas, porém, quando o crustáceo é exposto à temperatura ambiente essas enzimas podem ser novamente ativadas (NIRMAL; BENJAKUL, 2010).

A melanose se desenvolve antes da deterioração por microrganismos, portanto não representa riscos à saúde humana e apesar de não alterar características sensoriais como aroma

e sabor, o maior impacto da melanose está relacionado com a qualidade sensorial do camarão, devido à cor e aparência desagradável. Isso causa rejeição pelos consumidores que associam o escurecimento à deterioração e decomposição, a consequência disso é o impacto econômico negativo (GONÇALVES *et al.*, 2015; SENAPATI *et al.*, 2017; GONÇALVES; SANTOS, 2018).

Para inibir o desenvolvimento das manchas e aumentar a vida útil do camarão é comum o uso de sulfitos e ácidos (MONTERO *et al.*, 2001) que são aditivos sintéticos utilizados como agentes antioxidantes e antimicrobianos.

O metabissulfito de sódio (MBS), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, é o aditivo mais utilizado para inibir a melanose. A aplicação se dá por meio de imersão do camarão em tanques com água, gelo e uma solução a base de metabissulfito. Ostrensky e Cozes (2017) ressaltam que a concentração utilizada deve estar de acordo com legislação do país a que se destina o camarão.

No Brasil o limite máximo de metabissulfito de sódio permitido é de 100 ppm em amostras cruas. O FDA (*Food and Drug Administration*), por sua vez, estabelece o limite de 1,25% por 10 min. Valença e Mendes (2004), entretanto, observaram que não há padrão ou atendimento às normas pelos produtores já que é comum nas fazendas a aplicação de 5 a 10% de MBS por 2 a 20 min.

Quando aplicado de forma abusiva o metabissulfito de sódio pode desencadear reações adversas como náuseas, dores abdominais, vômitos, reações na pele, asfixia e pneumonite química em consumidores e manipuladores e, devido a essa toxicidade, seu uso é limitado. Além disso, os resíduos, quando descartados no ambiente podem alcalinizar a água causando a morte de várias espécies aquáticas (ARAÚJO; ARAÚJO, 2011; ANDRADE *et al.*, 2015). O uso excessivo desses compostos, pode ainda afetar a qualidade sensorial do camarão após a cocção (MCEVILY *et al.*, 1991; ANDRADE *et al.*, 2015).

Sae-Leaw e Benjakul (2019), reuniram em uma revisão de literatura vários estudos realizados com extratos vegetais de diversas plantas que comprovam que os polifenóis presentes nesses extratos possuem capacidade de inibir o desenvolvimento da polifenoxidase atuando como conservantes e antimelanóticos naturais alternativos aos sintéticos.

3.3 Conservantes naturais

Os efeitos negativos dos conservantes sintéticos e a mudança no comportamento alimentar da população são fatores que estimulam pesquisadores de diversas áreas para o desenvolvimento de conservantes seguros, obtidos a partir de fontes naturais. Alguns deles são

os extratos de plantas (SAE-LEAW; BENJAKUL, 2019) com potencial antioxidante, antimicrobiano e antimelanótico possíveis de serem empregados em alimentos como alternativa aos conservantes sintéticos já utilizados comercialmente (CLARKE *et al.*, 2017).

Os conservantes naturais são compostos químicos que podem ser derivados de plantas, animais e microrganismos (SINGH *et al.*, 2010). Os componentes de maior interesse nos extratos vegetais são os compostos fenólicos e os flavonoides. Campêlo *et al.* (2019), explicam que quando adicionados aos alimentos, os compostos fenólicos atuam como redutores, doando hidrogênio e supressores de oxigênio, atuando como antioxidantes nos alimentos. Esses mesmos autores relatam a capacidade dos flavonoides de eliminar os radicais livres.

Embora existam relatos sobre o interesse acerca dos conservantes naturais datados de 1980 (BREWER, 2011), o uso desses compostos pela indústria ainda não se consolidou. Atualmente, alimentos mais próximos do natural, minimamente processados e mais saudáveis são uma exigência de consumidores que estão cada vez mais informados e mais preocupados com a saúde e com o ambiente (GUNYAKTI; ASAN-OZUSAGLAM, 2018; KARRE *et al.*, 2013; ORIANI *et al.*, 2014).

Os requisitos para que um composto seja utilizado como conservante natural em alimentos são: segurança, estabilidade durante o processamento e eficácia antimicrobiana e antioxidante (PRANGE *et al.*, 2005). É importante que ele seja eficaz em baixas concentrações, que não cause efeitos indesejáveis relacionados aos atributos sensoriais do alimento como alteração na cor, no aroma e no sabor, seja compatível com o alimento, se mantenha estável durante o processamento e armazenamento e, é imprescindível que não seja tóxico (NKUKWANA *et al.*, 2014).

Basiri *et al.* (2015), testaram os efeitos do extrato de casca de romã (*Punica granatum*) como conservante em camarão (*Litopenaeus vannamei*) resfriado e observaram que o extrato retardou consideravelmente as contagens de bactérias mesófilas e a melanose além de diminuir o TBARS sugerindo o extrato como alternativa ao uso do metabissulfito de sódio.

Ao utilizarem o extrato da casca de laranja na conservação *L. vannamei*, armazenado por dez dias sob refrigeração, Vakili e Ardakani (2018) observaram melhores resultados de n-BVT, TBARS, pH, atributos sensoriais e inibição da melanose no grupo tratado com o extrato quando comparado ao grupo controle, confirmando a ação antioxidante e antimicrobiana do extrato da casca de laranja.

Sae-leaw e Benjakul (2019), testaram o extrato da folha de várias espécies. Os autores relataram que o extrato da folha de caju apresentou a maior atividade inibitória de polifeloxidase

(PPO) em todas as concentrações testadas (0,025 – 0,5%). Assim, comprovaram que polifenóis de diferentes plantas têm potencial como inibidores de PPO.

3.3.1 Quitosana como conservante natural

Foi no início do século passado que a quitosana começou a despertar maior interesse da indústria e passou a ser explorada em função das suas propriedades funcionais, antimicrobianas e antioxidantes, bem como de suas características de polímero atóxico, biodegradável, biocompatível e de formação de filmes (SILVA *et al.* 2019; MUXIKA *et al.*, 2017)

A quitosana é um polissacarídeo catiônico, produto da desacetilação da quitina, obtido através de hidrólise alcalina (BESSA-JUNIOR; GONÇALVES, 2013; SANTOS *et al.*, 2017), pode ser encontrada no exoesqueleto dos insetos, na cutícula dos anelídeos e moluscos, nas paredes celulares de fungos e leveduras e na carapaça de crustáceos como camarão, lagosta e caranguejo (KURITA, 2006).

Younes *et al.* (2014), apresentaram em seu estudo a atividade antimicrobiana desenvolvida pela quitosana contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *M. luteus*, *B. cereus* e *E. faecalis*), Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *S. typhi*) e fungos (*F. oxysporum*, *F. solani* e *F. Sp*). Devlieghere *et al.* (2004) destacam que a atividade antimicrobiana (bactericida e fungistática), está relacionada à capacidade de induzir alterações morfofisiológicas nas paredes celulares dos microrganismos.

Por sua vez, Barbosa *et al.* (2015), destacam que os compostos naturais atuam interagindo com moléculas alvo, interferindo nas funções das células dos microrganismos, gerando modificações nas propriedades da membrana citoplasmática e no metabolismo energético além de inibirem a síntese de ácido nucleico.

Santos *et al.* (2017), utilizaram a quitosana 1% para recobrir filés de tilápia combinados com defumação líquida e observaram que a atividade antimicrobiana da quitosana melhorou consideravelmente a qualidade dos filés.

O uso da quitosana na elaboração de filmes e revestimentos tem representado um papel importante para a conservação de alimentos (KERCH, 2015). Para Assis *et al.* (2003), as características físico-químicas que resultam em propriedades mecânicas e a capacidade filmogênica colocam a quitosana em destaque como matéria prima para elaboração de filmes e revestimentos comestíveis pois além de ser de fácil obtenção é economicamente viável.

Hu e Ganzle (2018) relatam que a quitosana melhora a qualidade dos alimentos independentemente de sua atividade antimicrobiana e que em alguns casos, por exemplo, o

retardo da oxidação lipídica ou inibição da melanose favorece a aplicação da quitosana mesmo se o efeito antimicrobiano for limitado.

A quitosana tem sido amplamente aplicada na conservação de pescado, incluindo ostras, sardinha, salmão, robalo e carpa prateada (CAO *et al.*, 2009; MOHAN *et al.*, 2012). Mostrou-se eficaz também na manutenção da qualidade e prolongamento da vida de prateleira de camarões (WU, 2014).

Para Pereira de Abreu *et al.* (2012), a aplicação de coberturas comestíveis tem demonstrado resultados benéficos na conservação de pescado, atuando como barreira contra a penetração de umidade e oxigênio. A quitosana é, portanto, um conservante de alimentos promissor em aplicações específicas.

3.3.2 Extrato de própolis como conservante natural

A própolis é um material resinoso coletado por abelhas (*Apis mellifera*), é uma mistura complexa, formada por aproximadamente 45% de material resinoso e balsâmico, coletada dos ramos de plantas pelas abelhas, 30% de cera de abelha e ácidos graxos, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 10% de outros compostos orgânicos e minerais (TYLKOWSKI *et al.*, 2010). Esses compostos podem ser flores, brotos e exsudados de árvores; além desses, na colmeia as abelhas adicionam secreções salivares (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1996).

A composição química da própolis pode variar conforme a sazonalidade, região de onde foi coletada e origem botânica, pode ter coloração variando do amarelo-esverdeado passando pelo marrom-avermelhado até o negro. A variação na composição química influencia significativamente o potencial de ação da própolis (SFORCIN *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2007; INOUE *et al.*, 2007).

Na própolis pode ser encontrada uma variedade de compostos químicos, como polifenóis (flavonóides, ácidos fenólicos e ésteres), terpenóides, esteróides e aminoácidos, aldeídos voláteis e cetonas (DUMAN e OZPOLAT, 2014). Os flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres são os principais componentes bioativos que estão diretamente relacionados à atividade antioxidante e antimicrobiana da própolis (NAGGAR *et al.*, 2016; WOŹNIAK *et al.*, 2019).

Popularmente conhecidas como própolis verde e própolis vermelha, os dois tipos de própolis brasileiras são bastante apreciados do ponto de vista científico e comercial (SOUSA *et al.*, 2019). A própolis verde proveniente do alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*), mais comumente encontrada nas regiões Sul e Sudeste, e a própolis vermelha, ou própolis vermelha

brasileira, é proveniente da região de mangue do Nordeste e tem como origem botânica o rabo de bugio (*Dalbergia ecastophyllum*) (TEIXEIRA *et al.*, 2005).

Os usos da própolis são inúmeros devido as suas diversas funções, dentre elas, os amplos aspectos de atividade antimicrobiana e as propriedades antioxidantes despertam o interesse da indústria alimentícia (PARK *et al.*, 1998). Na indústria cárnea seu uso está relacionado à preservação da oxidação lipídica como alternativa ao uso de antioxidantes sintéticos (ALVES *et al.*, 2013).

Os revestimentos de quitosana e outros biopolímeros são hidrofílicos (MENDES *et al.*, 2016), dessa forma, o uso da quitosana combinada com o extrato de própolis, que é um composto hidrofóbico, poderá otimizar algumas das propriedades dos filmes poliméricos (PASTOR *et al.*, 2010) garantindo melhores resultados na qualidade e vida útil dos produtos revestidos.

3.4 Revestimentos comestíveis

Revestimentos comestíveis podem ser descritos como qualquer camada de material fino, elaborados a partir de polissacarídeos, proteínas e lipídeos (CAZON *et al.*, 2017). Eles são utilizados para revestir alimentos com o objetivo de prolongar a vida de prateleira, podendo ser consumidos de maneira segura juntamente com o alimento recoberto (DEHGHANI *et al.*, 2018).

Os revestimentos comestíveis surgem como tecnologia para aumentar a vida útil dos alimentos, processados e frescos, atuando como barreira de proteção a fatores extrínsecos. Eles contribuem com a manutenção e preservação dos componentes naturais dos alimentos, reduzindo trocas gasosas superficiais bem como a atividade de água (CAETANO *et al.*, 2018; GE *et al.*, 2018; SALGADO *et al.*, 2015).

Os revestimentos modificam a atmosfera interna do alimento devido à capacidade de promover alterações na permeação que consequentemente altera o metabolismo responsável pela deterioração do alimento (TURHAN, 2010). Eles apresentam como vantagens a preservação dos atributos sensoriais e da aparência do produto e quando possuem baixa permeabilidade a gases podem promover a redução de escurecimento enzimático (CARVALHO FILHO *et al.*, 2006).

Atarés *et al.* (2016) citam como vantagem adicional dos revestimentos comestíveis a atuação como veículos para ingredientes ativos comestíveis que podem ser adicionados às formulações. Uma outra vantagem, citada por Tharanathan (2003), é que a formulação de um

revestimento composto pode ser feita sob medida para atender às necessidades de um produto específico.

O FDA (2016) preconiza que os materiais empregados devem ser atóxicos e seguros, uma vez que passarão a fazer parte do alimento.

Debeaufort *et al.* (1998), citam como pré-requisitos gerais mais importantes a serem cumpridos por filmes e revestimentos comestíveis: boas qualidades sensoriais; alta propriedade de barreira e mecânicas; estabilidade bioquímica, físico-química e microbiana; ser atóxico e seguro para a saúde; possuir tecnologia simples; não ser poluente e possuir matéria-prima e processo de baixo custo.

Yuan *et al.* (2016), investigaram os efeitos da quitosana combinada com extrato de romã em camarão branco armazenada em gelo. Os autores observaram que houve efeito sinérgico entre o extrato da casca de romã e a quitosana, resultando na redução das bases voláteis totais, redução do desenvolvimento de microrganismos aeróbios totais e inibição da melanose.

A combinação de extrato de própolis com quitosana foi testada por Ebadi *et al.* (2019). Os autores aplicaram o revestimento em filés de *Nemipterus japonicus* e os resultados obtidos demonstraram que houve redução efetiva no crescimento de mesófilos totais e psicrotóficas, oxidação lipídica e decomposição de proteínas.

Berizi *et al.* (2018) analisaram a combinação de quitosana com extrato da casca de romã em filés de truta arco-íris congelados por seis meses. Na ocasião, verificaram que houve melhoria considerável nas propriedades químicas e sensoriais e ainda redução da carga microbiana.

A incorporação de extrato de própolis à quitosana foi analisada por Marquez *et al.* (2018). O revestimento foi aplicado em filés de *Piaractus brachypomus* e foi observado que o extrato de própolis aumentou significativamente a estabilidade dos indicadores de qualidade físico-química, sensorial e microbiológica dos filés, destacando-se a redução da oxidação lipídica.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. T.; ARAUJO, N. G.; VENTURA, A. P. M.; LIRA, A. L.; MAGNANI, M.; CAVALHEIRO, J. M. O. Standardization of sodium metabisulfite solution concentrations and immersion time for farmed shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Ciência Rural**. n. 45, p. 499-504. 2015.
- ALOTAIBI, S.; TAHERGORABI, R. Development of a sweet potato starch-based coating and its effect on quality attributes of shrimp during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 88, p. 203–209, 2018.
- ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 37-41, 2013.
- ARANCIBIA, M.Y.; LOPEZ-CABALLERO, M.E.; GOMEZ-GUILLEN, M.C.; MONTERO, P. Chitosan coatings enriched with active shrimp waste for shrimp preservation. **Food Control**, v. 54 p. 259–266, 2015.
- ARAÚJO, F.R.; ARAÚJO, Y.M.G. Prática inadequada: substâncias liberadas na despesca do camarão podem provocar a morte. **Revista Proteção**, p.114-120, 2011.
- ASSIS, O. B.G.; SILVA, V. L. da. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, 2003.
- ATARÉS, L.; CHIRALT, A.; MCELHATTON, A. Use of Edible Coatings, a Novel Preservation Method for Nuts. **Modernization of Traditional Food Processes and Products**, p. 93–101, 2016.
- BARBOSA, L. N. *et al.* In vitro Antibacterial and Chemical Properties of Essential Oils Including Native Plants from Brazil against Pathogenic and Resistant Bacteria. **Journal of Oleo Science**, v. 64, n. 3, p. 289–298, 2015.
- BASIRI, S.; SHEKARFOROUSH, S. S.; AMINLARI, M.; AKBARI, S. The effect of pomegranate peel extract (PPE) on the polyphenol oxidase (PPO) and quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 1025–1033, 2015.
- BERIZI, E.; HOSSEINZADEH, S.; SHEKARFOROUSH, S. S.; BARBIERI, G. Microbial, chemical, textural and sensory properties of coated rainbow trout by chitosan combined with pomegranate peel extract during frozen storage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 1004–1013, 2018.
- BESSA-JUNIOR, A. P.; GONÇALVES, A. A. Análises econômica e produtiva da quitosana extraída do exoesqueleto de camarão. **Actapesca**. v. 1, n. 1, p. 13-28, 2013.

BREWER, M.S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 10, n.4, p. 221-247, 2011.

BOGDANOVIC, T. *et al.* Development and Application of Quality Index Method Scheme in a Shelf-Life Study of Wild and Fish Farm Affected Bogue (*Boops boops*, L.). *Journal of Food Science*, v.77, n.2, p. S99-106. 2012.

CAETANO, K. S.; LOPES, N. A.; COSTA, T. M. H.; BRANDELLI, A.; RODRIGUES, E.; FLÔRES, S. H.; CLADERA-OLIVERA, F. Characterization of active biodegradable films based on cassava starch and natural compounds. *Food packaging and shelf life*, v. 16, p. 138-147, 2018.

CAMPÊLO, M. C. S.; MEDEIROS, J. M. S.; SILVA, J. B. A. Natural products in food preservation. *International Food Research Journal*, v. 26, n. 1, p. 41-46, 2019.

CASTRO, M. L.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Química Nova*, v. 30, p. 1512-1516, 2007.

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

CAO, R.; XUE, C. H.; LIU, Q. Changes in microbial flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during refrigerated storage and its shelf-life extension by chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, v. 131, n. 2, p. 272-276, 2009.

CARVALHO FILHO, C. D.; HONORIO, S. L.; GIL, J. M. Qualidade pós-colheita de cerejas cv. Ambrunes utilizando coberturas comestíveis. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 180-184, 2006.

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

CINTRA, I. H. A.; OGAWA, N. B. P.; SOUZA, M. R.; DINIZ, F. M.; OGAWA, M. Decomposition of trimethylamine oxide related to the use of sulfites in shrimp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 19, n. 3, p. 314-317, 1999.

CLARKE, D.; TYUFTIN, A. A.; CRUZ-ROMERO, M. C.; BOLTON, D.; FANNING, S.; PANKAJ, S. K.; BUENO-FERRER, C.; CULLEN, P. J.; AND KERRY, J. P. Surface attachment of active antimicrobial coatings onto conventional plastic-based laminates and performance assessment of these materials on the storage life of vacuum packaged beef sub-primals, *Food Microbiology*, 62, p. 196-201, 2017.

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J. A; VOILLEY, A. Edible films and coatings: tomorrow's packaging: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 38, n. 4, p. 299-313, 1998.

DEHGHANI, S.; HOSSEINI, S. V.; REGENSTEIN, J. M. Edible films and coatings in seafood preservation: A review. **Food Chemistry**, v.240, p. 505–513, 2018.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: Possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 4, p.273-285, 2004.

DHIMAN, R.; AGGARWAL, N.; ANEJA, K.R.; KAUR, M. In vitro antimicrobial activity of spices and medicinal herbs against selected microbes associated with juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 2016, p. 9015802, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/9015802>. Acesso em: 08 jan. 2021.

DUMAN, M.; ÖZPOLAT, E. Effects of water extract of propolis on fresh shibuta (*Barbus grypus*) fillets during chilled storage. **Food Chemistry**, v. 189, p. 80–85, 2015.

EBADI, Z.; KHODANAZARY, A.; HOSSEINI, S. M.; ZANGUEE, N. The shelf life extension of refrigerated *Nemipterus japonicus* fillets by chitosan coating incorporated with propolis extract. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 94–102, 2019.

EVANGELISTA, J. Tecnologia de Alimentos, **Atheneu**, 2 ed, p. 279-389, 1998.

FALLEH, H.; BEN JEMAA, M.; DJEBLAI, K.; ABID, S.; SAADA, M.; KSOURI, R. Application of the mixture design for optimum antimicrobial activity: Combined treatment of *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Myrtus communis*, and *Lavandula stoechas* essential oils against *Escherichia coli*. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 12, p. 1-11, 2019.

FARAJZADEH, F.; MOTAMEDZADEGAN, A.; SHAHIDI, S. A.; HAMZEH, S. The effect of chitosan-gelatin coating on the quality of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under refrigerated condition. **Food Control**, v. 67, p. 163-170, 2016.

FARIA, J. A. F.; CRUZ, A. G.; GONÇALVES, A. A. Embalagem Ativa e com Atmosfera Modificada (Capítulo 2.2.1 – p. 209-216). In: Gonçalves, A. A. (Ed.). Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo, SP: Atheneu, 608 p., 2011.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome, 2020.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FAD. **Generally recognized as safe (GRAS)**. Silver Spring. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>. Acesso em: 15 outubro 2020.

FURLAN, E. F. Valoração da qualidade do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) desembarcado no litoral de São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 3, p. 317-326, 2011.

GE, L.; ZHU, M.; LI, X.; XU, Y.; MA, X.; SHI, R.; MU, C. Development of active rosmarinic acid-gelatin biodegradable films with antioxidant and long-term antibacterial activities. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 308-316, 2018.

- GONÇALVES, A.A.; LIRA SANTOS, T.C., Ozone technology associated with modified atmosphere package: Improving the quality and the shelf life of whole chilled Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p. 568-575, 2018.
- GONÇALVES, A. A.; OLIVEIRA A. R. M. Melanosis in crustaceans: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 791-799, 2016.
- GONÇALVES, A. A.; OLIVEIRA, A. R. M. DE; ABRANTES, M. R. Acerola Fruit as a Possible Antimelanotic Agent in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Food Processing**, p. 1–9, 2015.
- GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: Editora Atheneu, v. 1, 608p. 2011.
- GHISALBERTI, E.L. Propolis: A review. **Bee World**, v.60, p.59-84, 1979.
- GUNYAKTI, A.; ASAN-OZUSAGLAM, M. Investigation of the potential use of *Lactobacillus gasseri* originated from human breast milk as food additive. **LWT Food Science and Technology**, v. 93, p. 613–619, 2018.
- HU, Z.; GÄNZLE, M. G. Challenges and opportunities related to the use of chitosan as food preservative. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, p. 1318-1331, 2018.
- INOUE, H.T.; SOUSA, E.A.; ORSI, R. O.; FUNARI, S.R.C.; BARRETO, L.M.R.C.; DIB, A.P.S. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. **Asociación Latinoamericana de Producción Animal**, v. 15 n. 2, p. 65-69, 2007.
- JESCOVITCH, L. N.; ULLMAN, C.; RHODES, M.; DAVIS, D.A. **Effects of different feed management treatments on water quality for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*** **Aquaculture Research**, v. 49, n. 1, p. 526-531, 2018.
- KARRE, L.; LOPEZ, K.; GETTY, K. J. Natural antioxidants in meat and poultry products. **Meat science**, v. 94(2), p. 220-227, 2013.
- KERCH, G. Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v.46, n. 2, p. 159–166, 2015.
- KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers of marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 8, p. 203-226, 2006.
- MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, São Paulo, SP, v.19, n.5, p. 529-536, 1996.
- MÁRQUEZ, D. G. P.; FUENMAYOR, C. A.; MAHECHA, H. S. Effect of chitosan-propolis edible coatings on stability of refrigerated cachama (*Piaractus brachypomus*) vacuum-packed fish fillets. **Packaging Technology and Science**, p. 1-11, 2018.

MARTÍNEZ-ALVAREZ, O.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Role of Sulfites and 4-Hexylresorcinol in Microbial Growth and Melanosis Prevention of Deepwater Pink Shrimp (*Parapenaeus longirostris*) Using a Controlled Atmosphere. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 1, p. 98–104, 2005.

MCEVILY, A. J.; IYENGAR, R.; OTWELL, S. Sulfites Alternatives Prevents Shrimp Melanosis. **Food Technology**, Florida, p. 81–86, 1991.

Valença; A.R; Mendes, G.N. O metabissulfito de sódio e seu uso na carcinicultura. Panorama da Aquicultura, v.14, n.85, p. 57–59, 2004.

MOHAN, C. O.; RAVISHANKAR, C. N.; LALITHA, K. V.; SRINIVASA GOPAL, T. K. Effect of chitosan edible coating on the quality of double filleted Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*) during chilled storage. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 167–174, 2012.

MONTERO, P.; LOPEZ-CABALLERO, M. D.; PEREZ-MATEO, M. The effect of inhibitors and high-pressure treatment melanosis and microbial growth on chilled prawns (*Penaeus japonicus*). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 66, n. 8, p. 1201-1206, 2001.

MENDES, J. F.; PASCHOALIN, R. T.; CARMONA, V. B.; NETO, A. R. S.; MARQUES, A. C. P.; MARCONCINI, J. M.; MATTOSO, L. H. C.; MEDEIROS, E. S.; OLIVEIRA, J. E. Biodegradable polymer blends based on corn starch and thermoplastic chitosan processed by extrusion. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 452–458, 2016.

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

NAGGAR, Y. A.; SUN, J.; ROBERTSON, A.; GIESY, J. P.; WISEMAN, S. Chemical characterization and antioxidant properties of Canadian propolis. **Journal of Apicultural Research**, Alexandria, v. 55, n. 4, p. 305-314, 2016.

NESPOLO, C. R.; OLIVEIRA, F. A.; PINTO, F. S. T.; OLIVERA, F. C. **Práticas em tecnologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2015.

NIRMAL N.P.; BENJAKUL S. Melanosis and quality changes of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) treated with catechin during iced storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n 9, p. 3578-3586, 2012.

NKUKWANA, T. T.; MUCHENJE, V.; MASIKA, P. J.; HOFFMAN, L. C.; DZAMA, K.; DESCALZO, A. M. Fatty acid composition and oxidative stability of breast meat from broiler chickens supplemented with Moringa oleifera leaf meal over a period of refrigeration. **Food Chemistry**, v. 142, p. 255-261, 2014.

OGAWA, M.; PERDIGÃO, N. B.; SANTIAGO, M. E.; KOZIMA, T. T. On physiological aspects of black spot appearance in shrimp. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 50, p. 1763–1769, 1984.

ORIANI, V. B.; MOLINA, G.; CHIUMARELLI, M.; PASTORE, G. M.; HUBINGER, M. D. Properties of Cassava Starch-Based Edible Coating Containing Essential Oils. **Journal of food science**, v. 79, n. 2, p. 189-194, 2014.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. **Bioscience, Biotechnology e Biochemistry**, v.62, n. 11, p. 2230-2232, 1998.

PASTOR, C.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHÁFER, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. **Carbohydrate Polymers, Barking**, v.82, n.4, p.1174-1183, 2010.

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

PEREIRA DE ABREU, D.A.; MAROTO, J.; VILLALBA RODRÍGUEZ, K.; CRUZ, J.M. Antioxidants from barley husks impregnated in films of low-density polyethylene and their effect over lipid deterioration of frozen cod (*Gadus morhua*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 427–432, 2012.

PRANGE, A.; BIRZELE, B.; HORMES, J.; MODROW, H. Investigation of different human pathogenic and food contaminating bacteria and mould grown on selenite/selenate and tellurite/tellurate by X-ray absorption spectroscopy. *Food Control*. v. 16, p. 713–72, 2005.

OSTRENSKY, A. Aspectos biológicos e fisiológicos de interesse para a carcinicultura. In: OSTRENSKY, A.; COZES, N. (ed). **A produção integrada na carcinicultura Brasileira: Princípios e práticas para se cultivar camarões marinhos de forma mais racional e eficiente**. 1. ed. Curitiba: Instituto GIA, v.2, 2017, p 24-62.

OKPALA, C. O. R.; CHOO, W. S.; DYKES, G. A. Quality and shelf life assessment of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) freshly harvested and stored on ice. **LWT Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 110-116, 2014.

OKPALA, C. O. R. Investigation of quality attributes of ice-stored Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as affected by sequential minimal ozone treatment, **LWT e Food Science and Technology**, v. 57 n. 2, p. 538-547, 2014.

SAE-LEAW, T.; BENJAKUL, S. Prevention of melanosis in crustaceans by plant polyphenols: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 85, p. 1–9, 2019.

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

SANTOS, F. M. S.; SILVA, A. I. M.; Vieira, C. B.; ARAÚJO, M. H.; SILVA, A. L. C.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; SOUZA, B. W. S.; BEZERRA, R. S. Use of chitosan coating in increasing the shelf life of liquid smoked Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillet. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 5, p. 1304–1311, 2017.

- SANTOS, C. H. A.; LOURENCO, J. A.; BAPTISTA, R. B.; IGARASHI, M. A. Crescimento e sobrevivência do camarão branco do pacífico *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) em diferentes salinidades. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 783-789, 2009.
- SENAPATI S. R.; KUMAR G. P.; SINGH C. B.; XAVIER K. M.; CHOUKSEY M. K.; NAYAK, B. B. Melanosis and quality attributes of chill stored farm raised whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Applied and Natural Science**, v. 9, p. 626–631, 2017.
- SFORCIN, J.M.; FERNANDES Jr, A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 243-249, 2000.
- SILVA, S. B.; SOUZA, D.; LACERDA, L. D. Food Applications of Chitosan and its Derivatives. **Chitin and Chitosan**, p. 315–347. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781119450467.ch13>. Acesso em: 08 jan 2020.
- SINGH, A.; SHARMA, P. K.; GARG, G. Natural products as preservatives. **The International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 1, p. 101–112, 2010.
- SOUSA J. P. L. M.; PIRES, L. O.; PRUDÊNCIO, E. R.; SANTOS, R. F.; SANT'ANA, L. D.; FERREIRA, D. A. S.; CASTRO, R. N. Estudo Químico e Potencial Antimicrobiano da Própolis Brasileira Produzida por Diferentes Espécies de Abelhas. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 5, p. 1480-1497, 2019.
- SOUZA, M. M. M.; FURTUNATO, D. M. N.; CARDOSO, R. C. V.; ARGÔLO, S. V.; SILVA, I. R. C. S.; SANTOS, L. F. P. Avaliação do frescor do pescado congelado comercializado no mercado municipal de São Francisco do Conde-BA. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 359-368, 2013.
- THARANATHAN, R. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, n. 3, p. 71–78, 2003.
- TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MEIRA, R.M.; MESSAGE, D.; S ALATINO, A. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.1, p.85- 92, 2005
- TSIRONI, T.; DERMESONLOUOGLOUA, E.; GIANNAKOUROUA, M.; TAOUKIS, P. Shelf life modelling of frozen shrimp at variable temperature conditions. **Food Science and Technology**, v. 42, n. 2, p. 664-671, 2009.
- TURHAN, K. N. Is edible coating an alternative to MAP for fresh and minimally processed fruits. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 876, n. 1, p. 299-305, 2010.
- TYLKOWSKI, B.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V.; GIAMBERINI, M.; PEEV, G.; NIKOLOVA, A. Extraction of biologically active compounds from propolis and concentration of extract by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 348 n. 1-2, p. 124–130, 2010.

VAKILI, S.; ARDAKANI, S. A. Y. Antioxidant effect of orange peel extract on chemical quality, sensory properties, and black spots of farmed white shrimp. **Journal of Nutrition and Food Security**, v. 3, n. 1, p. 19–26, 2018.

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

WOŹNIAK, M.; MRÓWCZYŃSKA, L.; WAŚKIEWICZ, A.; ROGOZIŃSKI, T.; RATAJCZAK, I. Phenolic profile and antioxidant activity of propolis extracts from Poland. **Natural Product Communications**, v. 14, n. 5, p. 1934578X19849777, 2019.

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

YANG, H.; FENG, K.; WEN, P.; ZONG, M.; LOU, W.; WU, H. Enhancing oxidative stability of encapsulated fish oil by incorporation of ferulic acid into electrospun zein mat. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 82-90, 2017.

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.

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

CAPÍTULO II
REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS DE QUITOSANA COM INCORPORAÇÃO DE
EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA

REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS DE QUITOSANA COM INCORPORAÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA

RESUMO

Objetivou-se com esse estudo obter e caracterizar revestimentos comestíveis à base de quitosana com incorporação de diferentes concentrações de extrato de própolis verde (EPVD) e vermelha (EPVM). Os extratos de própolis verde e vermelho foram caracterizados quanto aos teores de fenólicos totais (FT), flavonoides (FLA) e atividades antioxidante (AA). Foram produzidos 11 filmes através da técnica de *casting* a partir das soluções de revestimento de quitosana à 1,5% (Q), quitosana à 1,5% combinado com própolis verde (QPVD) e quitosana à 1,5% combinada com própolis vermelha (QPVM) nas concentrações 0,12%, 0,25%, 0,50%, 1,0% e 2,0% de extrato de própolis. Os filmes foram caracterizados através de análises das propriedades ópticas, de barreira, mecânicas, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e atividade antimicrobiana (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*). As análises de caracterização dos extratos demonstraram que ambos estavam dentro das recomendações da legislação brasileira, com melhores resultados de fenólicos totais (FT) e flavonoides (FLA) encontrados no EPVD e melhor atividade antioxidante (AA) no EPVM. Com relação a caracterização dos filmes, a luminosidade L^* diminuiu à medida que a concentração de extrato de própolis incorporado à quitosana aumentou, o a^* tendeu ao verde nos filmes de EPVD e o b^* ao amarelo em virtude da cor característica dos extratos. A opacidade e espessura dos filmes aumentaram em decorrência do aumento nas concentrações de extrato de própolis. O maior valor de solubilidade foi encontrado no filme Quitosana 1,5% (24,68) e menores valores nos filmes de Quitosana + extrato de própolis verde 0,50% (20,0 %) e Quitosana + extrato de própolis vermelha 1% (18,3%) a adição dos extratos ao filme de quitosana diminuiu a solubilidade. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na PVA em função da concentração de extrato de própolis nos filmes. A adição dos extratos melhorou a resistência à tração e a elasticidade dos filmes. O MEV revelou que os filmes com concentrações mais baixas de EP são mais regulares e homogêneos. Os resultados mostraram também que a incorporação do extrato de própolis aos filmes mesmo em concentrações mais baixas foi efetiva na inibição de *Escherichia coli*. Diante do exposto sugere-se que os extratos de própolis verde e vermelha são componentes eficazes quando combinados à quitosana, conferindo melhores resultados em propriedades fundamentais dos filmes e revestimentos comestíveis.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, biopolímeros, conservante natural, filme biodegradável.

EDIBLE CHITOSAN COATINGS WITH INCORPORATION OF GREEN AND RED PROPOLIS EXTRACT

ABSTRACT

The objective of this study was to obtain and characterize edible coatings based on chitosan with incorporation of different concentrations of green (EPVD) and red (EPVM) propolis extract. The extracts of green and red propolis were characterized according to the levels of total phenolics (FT), flavonoids (FLA) and antioxidant activities (AA). 11 films were produced using the casting technique from 1.5% chitosan coating solutions (Q), 1.5% chitosan combined with green propolis (QPVD) and 1.5% chitosan combined with red propolis (QPVM) in concentrations of 0.12%, 0.25%, 0.50%, 1.0% and 2.0% of propolis extract. The films were characterized by analysis of optical, barrier, mechanical properties, scanning electron microscopy (SEM) and antimicrobial activity (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*). The characterization analyzes of the extracts demonstrated that both were within the recommendations of the Brazilian legislation, with better results of total phenolics (FT) and flavonoids (FLA) found in EPVD and better antioxidant activity (AA) in EPVM. Regarding the characterization of the films, the L^* luminosity decreased as the concentration of propolis extract incorporated to chitosan increased, a^* tended to green in EPVD films and b^* to yellow due to the characteristic color of the extracts. The opacity and thickness of the films increased due to the increase in the concentrations of propolis extract. The highest solubility value was found in the film Chitosan 1.5% (24.68) and the lowest values in the films Chitosan + green propolis extract 0.50% (20.0%) and Chitosan + red propolis extract 1% (18.3%) the addition of the extracts to the chitosan film decreased the solubility. There was no significant difference ($p > 0.05$) in PVA due to the concentration of propolis extract in the films. The addition of the extracts improved the tensile strength and elasticity of the films. SEM revealed that films with lower concentrations of EP are more regular and homogeneous. The results also showed that the incorporation of the propolis extract to the films even at lower concentrations was effective in inhibiting *Escherichia coli*. In view of the above, it is suggested that green and red propolis extracts are effective components when combined with chitosan, providing better results in fundamental properties of edible films and coatings.

Keywords: Antimicrobial activity, biopolymers, natural preservative, biodegradable film.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a produção de filmes e revestimentos comestíveis a partir de bases poliméricas naturais ganhou interesse de pesquisadores de diversas áreas e os resultados representam grandes avanços para cadeia produtiva de alimentos. A razão principal por trás do interesse pelos biopolímeros são as demandas de consumidores que buscam produtos mais próximos do natural, sem aditivos sintéticos e também a preocupação com o ambiente.

Neste sentido, os biopolímeros comestíveis atendem muito bem estas demandas visto que são de origem natural, de fontes renováveis e biodegradáveis. Estes biopolímeros são principalmente as proteínas e os polissacarídeos (MELO *et al.*, 2017, AMADORI *et al.*, 2015; DWIVEDI *et al.*, 2014) que podem ser utilizados na matriz de filmes para embalagens ativas ou como revestimento de alimentos.

Dentre os polissacarídeos, a quitosana, produto da desacetilação da quitina, composto presente no exoesqueleto dos crustáceos, se destaca como polímero de qualidade alimentar (PIEDRAHÍTA MÁRQUEZ *et al.*, 2018), pelo grande potencial de formação de filme, atividade antimicrobiana e compatibilidade com outros compostos (SABAGHI *et al.*, 2015).

Hu e Gänzle (2018), ressaltam que os efeitos da ação dos compostos presentes na quitosana dependem da matriz alimentar e destacam também que os resultados positivos do seu uso em embalagens ativas e revestimentos de alimentos vão além da capacidade antimicrobiana, incluem retardo na oxidação lipídica, conservação da cor e dos nutrientes, manutenção do frescor e dos atributos sensoriais.

Atarés *et al.* (2016) citam que a biocompatibilidade é uma vantagem adicional que confere aos filmes e revestimentos a capacidade de atuar como veículo para componentes ativos de fontes naturais que ao se complementarem otimizam a ação dos filmes e dos revestimentos, promovendo resultados mais satisfatórios nas propriedades que atuam na conservação dos alimentos e aumentando a vida útil destes.

Para potencializar os filmes biopoliméricos são incorporados a eles outros compostos naturais que irão atuar melhorando as propriedades de barreira, propriedades mecânicas e a atividade antimicrobiana e antioxidante (TALÓN *et al.*, 2017).

A própolis e seus extratos etanólicos são fontes de muitas substâncias bioativas, possuindo mais de 200 compostos; o extrato é rico em compostos fenólicos e flavonoides, principais responsáveis pela atividade antimicrobiana e antioxidante. É importante ressaltar que a composição da própolis é variável, depende de questões sazonais, geográficas e da origem botânica coletada pelas abelhas (CAMPOS *et al.*, 2014), neste sentido, os fenólicos totais,

flavonoides e a atividade antioxidante também são variáveis em quantidade e por consequência em ação.

A combinação do extrato de própolis com a quitosana pode conferir ao material elaborado características interessantes associadas às propriedades de barreira, mecânicas, de atividade antimicrobiana e antioxidante. Havendo sinergia entre os compostos, o material obtido poderá ser uma alternativa para melhorar a conservação dos alimentos, prolongar a vida de prateleira e manter características sensoriais.

Diante do exposto, objetivou-se com o presente estudo obter e caracterizar revestimentos comestíveis à base de quitosana incorporados de diferentes concentrações de extrato de própolis vermelha e extrato de própolis verde.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN. Os extratos foram preparados no Laboratório de Análises Instrumentais e Sensoriais LANIS, a elaboração e obtenção dos filmes foi realizada no Laboratório de Processos Químicos LPQ, no Laboratório de Pós-Colheita foram realizadas as análises de caracterização do extrato de própolis, cor, PVA, espessura e solubilidade dos filmes. Dando continuidade à caracterização dos filmes, as análises mecânicas foram conduzidas no Laboratório de Ensaios Mecânicos, a Microscopia Eletrônica Varredura (MEV) foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura e por fim, as análises microbiológicas dos filmes foram realizadas no Laboratório de Inspeção de produtos de origem animal LIPOA.

2.1 Obtenção dos extratos de própolis

As amostras de própolis verde e vermelha foram fornecidas por apicultores de Minas Gerais e Alagoas, respectivamente.

A própolis bruta foi submetida à pré-limpeza para retirada de fragmentos e eventuais impurezas, foi lavada e seca à temperatura ambiente por 24 horas, após isto, foi embalada em sacos de polietileno e armazenada em freezer à temperatura de -5 °C durante 12 horas.

Os extratos foram obtidos a partir da metodologia proposta por Silva (2003) com adaptações. A própolis verde e vermelha foram trituradas, pesadas em porções de 300g, acondicionadas cada uma em recipiente de vidro âmbar com capacidade para 1 litro e dissolvidas em 700 ml de álcool etílico de cereais (álcool etílico de arroz) a 70% (v/v). A

mistura foi agitada manualmente, por um minuto, a cada três dias, durante um mês e armazenada em temperatura ambiente. Após este período, filtrou-se a suspensão em papel de filtro para obtenção dos extratos hidroalcóolicos das própolis.

2.2 Caracterização dos extratos

2.2.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi mensurada de acordo com o método de redução do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), descrito por Velazquez *et al.* (2003), com algumas modificações. Em uma alíquota de 1 mL de cada diluição (2-10 uL/mL) do extrato obtido foi adicionado 1,5 mL de DPPH (0,029 mg/mL) e, após agitação, os tubos foram deixados em repouso ao abrigo da luz por 15 minutos. As leituras de absorbância foram realizadas através do espectrofotômetro Gehaka modelo UV-340G a 517nm utilizando 1 mL de metanol e DPPH como controle. A atividade antioxidante dos extratos foi obtida considerando o percentual de inibição do radical DPPH, calculado conforme equação: $\text{Inibição (\%)} = [(Abs. \text{ controle} - Abs. \text{ amostra}) / Abs. \text{ controle}] \times 100$.

2.2.2 Fenólicos totais

Compostos fenólicos totais (CFT) foram determinados conforme a metodologia de Meda *et al.* (2005), através do uso do reagente Folin-Ciocalteu. Foi retirada uma alíquota de 0,5 mL do extrato de própolis (20 ppm) e adicionou-se 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (0,2 N) em tubo de ensaio, após 5 minutos, colocou-se 2 mL de carbonato de sódio (75g/L) e em seguida as amostras foram mantidas em repouso por 2 h ao abrigo da luz. A absorbância foi medida em espectrofotômetro Gehaka modelo UV-340G a 760nm, utilizando como branco metanol/H₂O 1:1. Os resultados obtidos foram extrapolados em curva de calibração obtida com padrão ácido gálico (20 a 200 ppm), e expressos em mg equivalente ácido gálico (EAG)/g de extrato de própolis.

2.2.3 Flavonoides

A concentração de flavonoides foi determinada conforme metodologia descrita por Meda *et al.* (2005) e Ahn *et al.* (2007), com adaptações. Uma alíquota de 5,0 mL da mesma

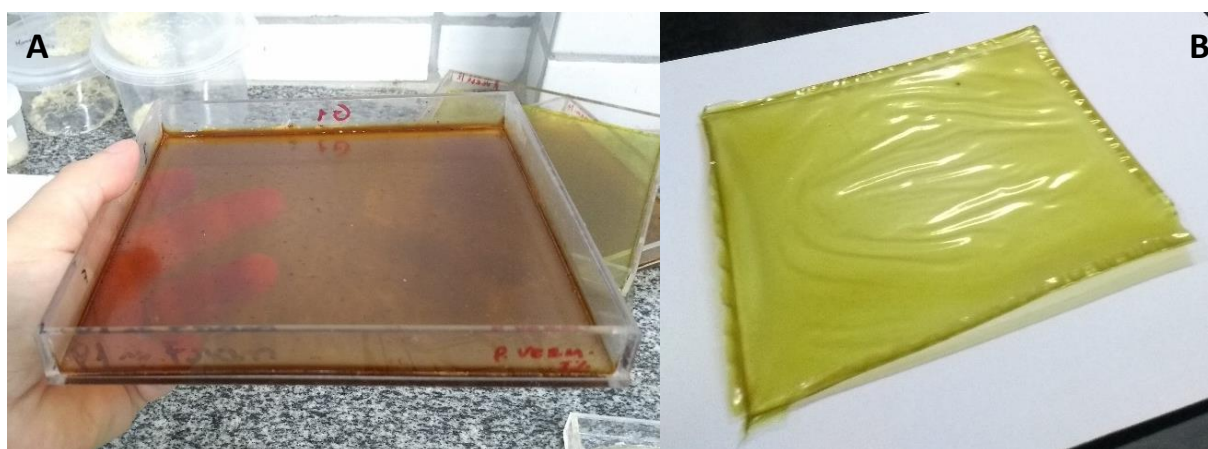
solução preparada para obtenção do teor de fenólicos totais (item 2.2.2) foi misturada com 5 mL de cloreto de alumínio (2%), em tubo de ensaio. Após 10 minutos, a absorbância foi lida em espectrofotômetro Gehaka modelo UV-340G em um comprimento de onda de 415 nm, utilizando como branco metanol para cada amostra. Uma curva de quercetina (5 a 50mg/L) foi usada como padrão. O conteúdo de flavonoides foi expresso em mg equivalente de quercetina (EQ)/g de extrato de própolis.

2.3 Preparação das soluções filmogênicas e obtenção dos filmes

As soluções filmogênicas foram elaboradas a partir da solução de quitosana contendo 1,5% de quitosana e 0,3% de glicerol, dissolvidos em ácido acético a 1% (p/v). As misturas foram gelatinizadas à temperatura ambiente utilizando agitadores magnéticos por 24 horas, após isto, incorporou-se individualmente os extratos de própolis verde e vermelha nas proporções 0,12%, 0,25%, 0,50%, 1,0% e 2,0% (v / v) sob agitação por 30 minutos, as misturas obtidas foram filtradas logo após.

Os filmes foram produzidos seguindo a técnica de evaporação do solvente ou *casting*, 60 mL das soluções filmogênicas foram depositadas sobre bandejas de acrílico de 15 x 15 cm (Figura 1) para evaporação total do solvente durante 4 ± 1 h, em estufa com circulação e renovação de ar à 40 °C. Em seguida, os filmes foram removidos cuidadosamente das bandejas com o auxílio de pinça inox.

Figura 1. Obtenção dos filmes pela técnica de *casting*.



A: Filme ainda na bandeja; B: Filme retirado da bandeja.

2.4 Caracterização dos filmes

2.4.1 Cor e Opacidade

Para medir a cor dos filmes utilizou-se um colorímetro Konica Minolta Sensing Inc. Japão, Color Reader modelo CR-10 de acordo com a metodologia descrita por Fakhouri *et al.* (2015). As análises foram realizadas, utilizando os padrões CIELab, identificados pelos seguintes atributos: L* [luminosidade (0 - preto, 100 - branco)], a* [de verde (-) ao vermelha (+)], e b* [de azul (-) a amarelo (+)].

A opacidade foi calculada através da relação entre a opacidade do filme colocado sobre um padrão preto e a opacidade do filme colocado sobre um padrão branco (ZAVAREZE *et al.*, 2012). Calculado pela equação: $Y = Y_{\text{preto}} / Y_{\text{branco}} \times 100$.

2.4.2 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada com o auxílio de um micrômetro digital Mitutoyo 0-25x0,001mm em 5 posições aleatórias dos filmes, próximos à região central, onde tem-se maior regularidade, em relação as extremidades. O resultado foi expresso em mm, pela média dos cinco pontos (LUCHESE *et al.*, 2015).

2.4.3 Solubilidade em água

Para determinação da solubilidade utilizou-se a metodologia descrita por Ge *et al.* (2015) com adaptações. Foram feitas amostras de 2 cm de diâmetro nos filmes, em quintuplicata, as amostras foram secas em estufa à 105°C por 1h e pesadas em uma balança de precisão para a determinação de sua massa inicial (m_i). Em seguida, as amostras foram imersas em 50 mL de água destilada e mantidas sob agitação mecânica por 24h a 26 °C. Após as 24 h, os filmes foram secos em estufa à 105 °C e pesados para a determinação da massa final (m_f). A matéria solúvel foi dada pela equação: $S = ((m_i - m_f) \times 100) / m_i$.

2.4.4 Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada segundo o método proposto por Zhao *et al.* (2018) com adaptações e em quintuplicata. As amostras cortadas em círculo

(diâmetro = 5,3 cm) foram utilizadas para vedar a abertura das células de permeação contendo água destilada. Os conjuntos célula-filme foram mantidos em dessecador com sílica, com umidade a 10% e temperatura $\pm 28^{\circ}\text{C}$. A massa dos sistemas foi medida a cada hora durante 12 h e a PVA determinada através da equação: $\text{PVA} = (\text{TPVA} \times \text{H}) / \Delta\text{P}$.

Onde: TPVA: taxa de permeabilidade ao vapor ($\text{g/m}^2\cdot\text{h}$), calculada a partir do coeficiente linear da reta dividido pela área de transferência (m^2), H: espessura do filme (mm), ΔP : diferença de pressão parcial (kPa). Os resultados foram expressos em $\text{g}\cdot\text{mm}/\text{h}\cdot\text{kPa}\cdot\text{m}^2$.

2.4.5 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes, módulo de elasticidade, tensão na ruptura e alongação na ruptura foram determinadas através de testes de tração em máquina de ensaio universal (DL5000/10000 Series EMIC 23), operando segundo a norma ASTM D-882-91. Os corpos de prova foram cortados em tiras (70 mm de comprimento x 5 mm largura) e fixadas em sonda específica, a distância de separação foi fixada em 100 mm e a velocidade do teste em 50 mm/s. Os ensaios foram realizados em quintuplicata.

2.4.6 Microscopia de varredura eletrônica (MEV)

Foram feitas eletromicrografias dos filmes (superfície e seção transversal), com dimensões de 50 μm , obtidas após metalização das amostras com ouro (camada de 5 nm), utilizando-se um Microscópio Eletrônico de Varredura Modelo VEGA 3 LMU. Para realização da análise, as amostras foram fixadas a stubs com auxílio de fitas de carbono, pinça e tesoura. Os aumentos utilizados foram de 1000, 2000 e 5000 vezes a uma tensão de 10 KV, com magnitude de 1Kx.

2.5 Atividade antimicrobiana

Para a análise antimicrobiana foram utilizadas as linhagens *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Estas encontravam-se suspensas em caldo Brain Heart Infusion - BHI e foram reativadas utilizando o mesmo meio de cultura. Para atingir o padrão de 0,5 de turvação da suspensão bacteriana na escala de McFarland utilizou-se a leitura de densidade óptica a 600 nm (OD600) por espectrofotometria.

Os discos de papel filtro esterilizados foram embebidos nas soluções filmogênicas, nas concentrações testadas (SILVA *et al.*, 2006) e colocados em placas de petri semeadas com inóculos das cepas padronizadas. Foi utilizado como controle positivo para bactérias gram-positivas (*S. aureus*) Cefalexina 30 µg e para gram-negativas (*E. coli* e *S. typhimurium*) Ampicilina 10 µg como controle negativo utilizou-se água destilada. As placas foram invertidas e incubadas a 36 °C durante 24 h. Em seguida, foram medidos os halos de inibição com auxílio de paquímetro. Para verificar a atividade antimicrobiana dos extratos utilizou-se os parâmetros estabelecidos pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2020).

A sensibilidade aos antimicrobianos foi avaliada de acordo com o tamanho do halo de inibição sendo classificados como: Não Ativo: menor que 9 mm; Atividade Parcial: 9-14 mm; Ativo: maior que 14 a 17 mm, e Muito Ativo: maior que 17 mm (AYRES *et al.*, 2008).

2.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. As médias foram agrupadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados foram analisados utilizando o software estatístico R.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos extratos de própolis

O teor de CFT encontrado no extrato de própolis verde (Tabela 1) foi mais elevado do que o encontrados no extrato de própolis vermelha. Variações nos teores de CFT ocorrem em função de diferentes fatores, e nos dois tipos de extratos de própolis utilizados nesse estudo, essa diferença está associada principalmente a sua origem botânica. De modo geral, as variações ocorrem em função da flora e região da coleta, sazonalidade da coleta da resina e genética da abelha rainha (ALVES; KUBOTA, 2013).

O extrato de própolis verde apresentou teores mais altos de flavonoides, 11,97 mg EQ/g enquanto que no EPVM este valor foi de 6,34 mg EQ/g. A determinação e quantificação do teor de flavonoides é de extrema importância quando se busca a utilização de extratos vegetais como antimicrobiano natural, já que a atividade antimicrobiana desses extratos, inclusive do extrato de própolis, está associada a este composto (BURDOCK, 1998). Quando empregado na

composição de revestimentos comestíveis, é importante que exista sinergia entre os compostos fenólicos e os compostos presentes na base polimérica utilizada para que se obtenha resultados satisfatórios na manutenção da qualidade do alimento.

Tabela 1. Teores médios de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante em extrato de própolis verde e extrato de própolis vermelha, Mossoró-RN, 2021.

Extratos	Análises		
	CFT (mg EAG/g)	FLA (mg EQ/g)	AA (CE ₅₀ µg/mL)
EPVD	48,87 ± 0,30	11,97 ± 0,28	6,87 ± 0,02
EPVM	21,47 ± 0,08	6,34 ± 0,09	5,10 ± 0,00

Resultados apresentados em média ± desvio padrão (n=2). EPVD: Extrato de própolis verde; EPVM: Extrato de própolis vermelha; CFT: Compostos fenólicos totais; FLA: Flavonoides; AA: Atividade antioxidante; EAG: equivalente de ácido gálico; EQ: equivalente de quercetina; CE₅₀: Concentração efetiva.

Assim como o teor de flavonoides, a determinação da atividade antioxidante de extratos vegetais é imprescindível quando se busca a aplicação destes em alimentos ou como componente de revestimentos comestíveis com o objetivo de conservar o alimento e aumentar a vida de prateleira.

A concentração efetiva – CE₅₀ determina a concentração efetiva de extrato de própolis necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH (GUTIERREZ-GONÇALVES; MARCUCCI, 2009). O EPVM apresentou menor CE₅₀ (5,10 µg/mL) e, portanto, maior capacidade antioxidante quando comparada com o EPVD (6,87 µg/mL).

No geral, o extrato de própolis verde apresentou melhores resultados de fenólicos totais e flavonoides enquanto que o extrato de própolis vermelha apresentou melhores resultados de atividade antioxidante. De acordo com Roesler *et al.* (2007), a interação de outros compostos não fenólicos, como por exemplo proteínas, com o reagente de Folin Ciocalteu, pode interferir na análise e aumentar o teor de fenólicos totais determinado por este método analítico; ainda segundo os mesmos autores, o baixo teor de compostos fenólicos e uma alta atividade antioxidante pode estar relacionada a outros compostos não mensurados que contribuem para aumentar a atividade antioxidante.

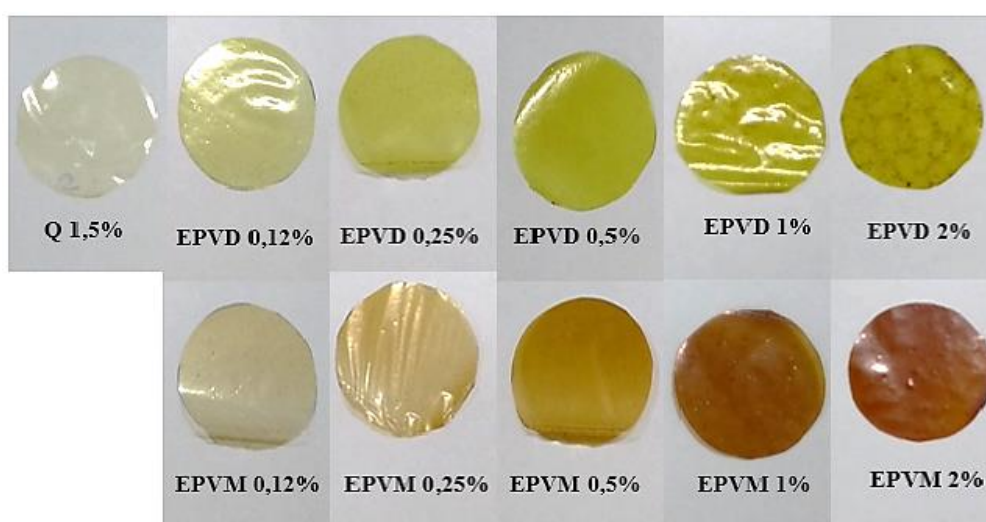
3.2 Caracterização dos revestimentos

A aparência é um fator decisivo na aquisição de um alimento, e para o consumidor, a cor é um dos atributos sensoriais mais relevantes na hora da compra de pescados e carnes em

geral, dessa forma, é importante que as propriedades ópticas dos revestimentos comestíveis não interfiram na cor característica do alimento recoberto.

Na Figura 2 é possível observar a aparência visual do filme de quitosana 1,5% e demais filmes obtidos a partir da incorporação de diferentes concentrações de extrato de própolis verde e vermelha à quitosana. Pode-se observar ainda que os filmes produzidos com maior concentração de extrato de própolis apresentaram coloração mais escura.

Figura 2. Aparência visual de filmes obtidos a partir da incorporação de diferentes percentuais de extrato de própolis verde e vermelha à quitosana.



Fonte: própria do autor (2020). Q: Quitosana; EPVD: extrato de própolis verde; EPVM: extrato de própolis vermelha.

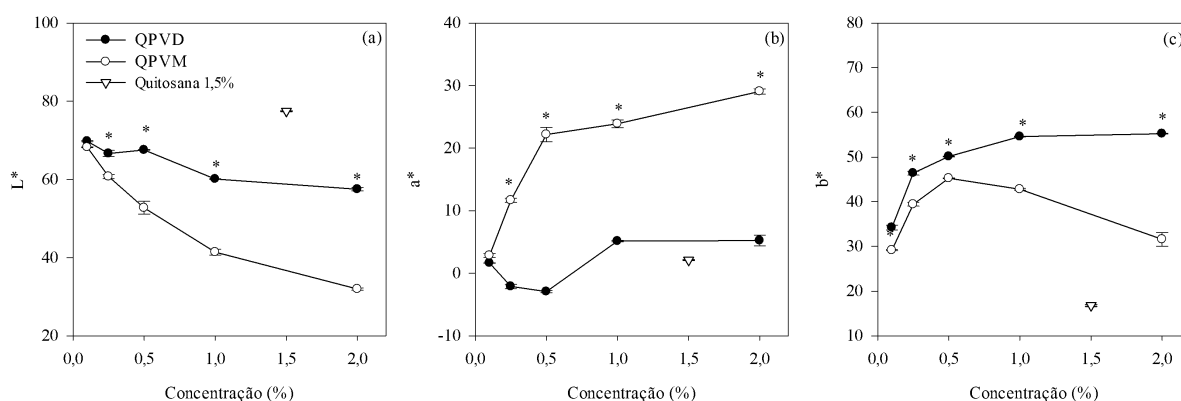
Quanto a luminosidade, houve redução à medida que a concentração de extrato de própolis verde e vermelha incorporado à quitosana aumentou (Figura 3 a). Os valores de L^* diferiram entre os tratamentos nas concentrações 0,25%, 0,50%, 1,0% e 2,0%. Os menores valores de L^* foram observados nos filmes com incorporação de 1,0 e 2,0% extrato de própolis vermelha (41,40 e 31,97). O filme Q apresentou índice de 77,47 sendo, portanto, a maior luminosidade encontrada.

Nos filmes QPVD (Figura 3 b), em especial, as concentrações 0,25% e 0,50% apresentaram valores negativos (-2,1 e -2,9) e, portanto, tenderam ao verde enquanto que nos filmes QPVM observou-se valores positivos e maiores em todas as concentrações dessa forma, tendendo ao vermelha.

O b^* quando negativo representa coloração azul e quando positivo representa amarelo, os valores de b^* (Figura 3 c) encontrados nos filmes QPVD e QPVM foram todos positivos o que indica a predominância da cor amarela sendo os valores mais altos encontrados em QPVD.

Estes resultados estão associados a coloração característica dos extratos e podem indicar que os filmes com menores concentrações de extrato de própolis, quando se trata da variável cor, são os mais indicados para aplicação em alimentos, pois além de melhores resultados de luminosidade a possibilidade de causar alterações na cor característica do alimento recoberto será menor ou nula.

Figura 3. Dados da variável cor (parâmetros L^* a^* b^*) em revestimentos de quitosana incorporados com diferentes concentrações de extrato de própolis verde e própolis vermelha.

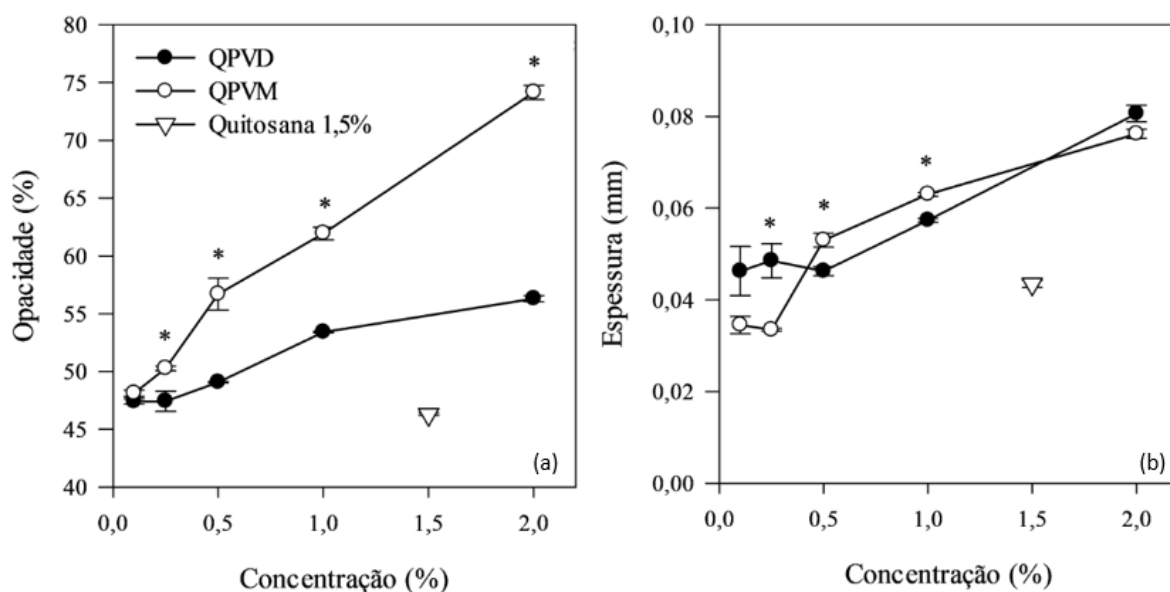


* Diferente estaticamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). QPVD: quitosana + extrato de própolis verde; QPVM: quitosana + extrato de própolis vermelha; Q1,5%: quitosana 1,5% (tratamento adicional - controle).

A opacidade (Figura 4 a) variou significativamente ($p < 0,05$) em função da concentração do extrato de própolis incorporado, no entanto, não houve variação quando a incorporação de EPVD foi de 0,12% 0,25% e 0,50% sendo estes também os filmes com menor índice de opacidade. Vale ressaltar que o valor encontrado em QPVD 0,12% (47,40) foi o mais próximo do resultado encontrado no filme Q (46,29). Pinheiro *et al.* (2010), alertam para o fato de que quanto maior a opacidade, menor será a quantidade luz atravessando o filme, atuando como uma barreira entre a luz e o alimento.

Quanto à espessura, os valores aumentaram com o aumento da concentração de EP (Figura 4 b), variando de 0,046 a 0,081 nos filmes QPVD e 0,035 a 0,076 nos filmes QPVM. Os maiores valores foram encontrados quando a incorporação do extrato à quitosana foi de 1,0% e 2,0%. De um modo geral, o aumento na opacidade acompanhou o aumento da espessura dos filmes. Sobral (2000) em seu estudo sobre a influência da espessura nas demais propriedades funcionais dos filmes, destaca que é importante avaliar as interferências da espessura embora muitas vezes esta não seja considerada.

Figura 4. Dados das variáveis opacidade e espessura em revestimentos de quitosana incorporados com diferentes concentrações de extrato de própolis verde e própolis vermelha.



* Diferente estaticamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). QPVD: quitosana + extrato de própolis verde; QPVM: quitosana + extrato de própolis vermelha; Q1,5%: quitosana 1,5% (tratamento adicional - controle).

A solubilidade em água dos filmes (Tabela 2) foi influenciada de forma significativa ($p < 0,05$) pela concentração de EP incorporada à quitosana. Esta variável foi maior no filme Q (23,36%) enquanto que os menores valores foram encontrados nos filmes QPVD 0,50% (20,0%) e QPVM 1% (18,3%).

Segundo Pelissari *et al.* (2013), não existe um valor ideal para a solubilidade, é necessário avaliar de acordo com o que se deseja do filme. Vicentini (2003), relata que quanto maior a solubilidade menor será a resistência do filme à água ou ambientes úmidos, portanto, entende-se que a incorporação do EPVD e EPVM melhorou a solubilidade dos filmes viabilizando o seu uso em alimentos com alto teor de umidade.

A PVA é uma importante propriedade para a escolha de um revestimento devido à sua estreita relação com as reações de deterioração dos alimentos (PEREDA *et al.*, 2012; AHMADI *et al.*, 2012). Na Tabela 2 é possível observar que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) em função da concentração de EP nem entre os tratamentos. Segundo Dick *et al.* (2015) a permeabilidade ao vapor de água sofre interferência da espessura do filme e para Müller *et al.* (2008) a PVA está relacionada com a solubilidade da água na matriz do filme.

Tabela 2. Dados das variáveis solubilidade e permeabilidade ao vapor de água (PVA) em revestimentos de quitosana incorporados com diferentes concentrações de extrato de própolis verde e própolis vermelha, Mossoró-RN, 2021.

Concentração (%)	Solubilidade (%)				PVA (g.mm/h.Kpam ²)			
	QPVD		QPVM		QPVD		QPVM	
0,12	22,7	aA	20,6	bA	0,23	aA	0,44	aA
0,25	21,2	aAB	22,0	aA	0,35	aA	0,30	aA
0,50	20,0	aB	20,4	aAB	0,30	aA	0,32	aA
1,00	22,5	aA	18,3	bC	0,37	aA	0,43	aA
2,00	21,1	aAB	18,6	bBC	0,40	aA	0,47	aA
Q1,5%	24,6				0,29			

Letra minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem estaticamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). QPVD: quitosana + extrato de própolis verde; QPVM: quitosana + extrato de própolis vermelha; Q1,5%: quitosana 1,5% (tratamento adicional - controle); PVA: permeabilidade ao vapor de água.

As propriedades mecânicas (Tabela 3) variaram ($p < 0,05$) em função da concentração do EP incorporado.

Nos filmes QPVD a resistência a tração (RT) foi maior nos filmes com menor concentração de EP já nos filmes QPVM não houve diferença estatística em função da concentração de extrato. Os filmes que apresentaram menores valores de ER foram de 1,0% e 2,0% de concentração e, portanto, são também os menos resistentes. Estes resultados indicam que incorporação de EP em concentrações mais baixas conferiu mais resistência aos filmes. Talón *et al.* (2017), argumentam que o desempenho mecânico de um filme depende da interação entre o composto ativo incorporado e a matriz polimérica.

Em seu estudo, Hoque *et al.* (2011) observaram aumento da RT em filmes à base de gelatina com incorporação de extrato de canela, cravo e estrela de anis, eles relatam que este comportamento está relacionado com a interação dos compostos fenólicos presentes nos extratos com a matriz polimérica.

A capacidade máxima que um filme suporta ao ser esticado até o seu rompimento é dada pela elongação na ruptura - ER (OZDEMIR; FLOROS, 2008), neste estudo, os filmes com maior concentração de EP apresentaram menor percentual de ER, logo, os filmes mais flexíveis foram EPVM 0,50% (52,81), Q (34,69) e EPVD 0,25 % (29,80).

O módulo de elasticidade se refere à rigidez do filme, quanto maior o ME maior será a rigidez do material e menor será a flexibilidade do filme (ROTTA; MINATTI; BARRETO, 2011). Os filmes diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) em função da concentração de EP incorporada à quitosana. Os filmes com menor concentração de extrato de própolis apresentaram menores valores de ME, QPVD 0,25% (1,44 Mpa) e QPVM 0,50% (0,60 Mpa)

foram os filmes mais flexíveis. Corrêa *et al.* (2011) relataram aumento na resistência a tração e módulo de elasticidade em filmes a base de pectina com incorporação de 5% de extrato de própolis vermelha em comparação com filmes sem incorporação do extrato.

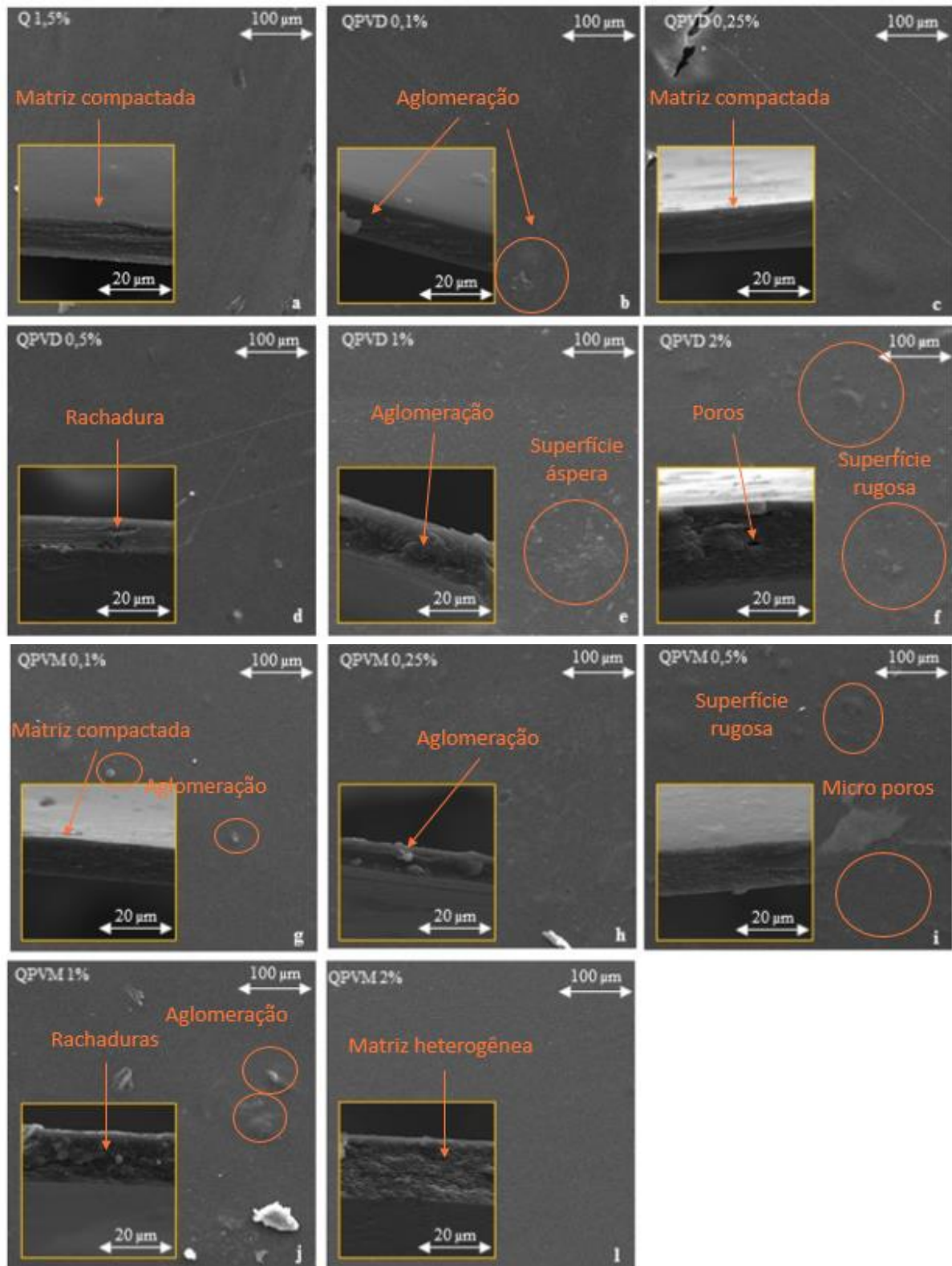
Tabela 3. Dados das propriedades mecânicas de revestimentos de quitosana incorporados com diferentes concentrações de extrato de própolis verde e própolis vermelha, Mossoró-RN, 2021.

Concentração (%)	RT (Mpa)				ER (%)				ME (Mpa)			
	QPVD		QPVM		QPVD		QPVM		QPVD		QPVM	
0,12	48,90	aA	43,85	aA	28,90	bA	41,11	aB	1,80	aCD	1,06	aB
0,25	42,94	aA	32,21	aA	29,80	aA	32,64	aB	1,44	aD	1,02	aB
0,50	41,51	aA	31,24	aA	14,19	bB	52,81	aA	2,98	aBC	0,60	bB
1,00	15,86	bB	33,48	aA	3,86	aB	9,59	aC	4,13	aB	3,52	aA
2,00	17,82	aB	29,18	aA	3,09	aB	8,75	aC	5,85	aA	3,37	bA
Q1,5%	22,97				34,69				0,66			

Letra minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem estaticamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). RT: Resistência a tração; ER: Elongação na ruptura; ME: módulo de elasticidade; QPVD: quitosana + extrato de própolis verde; QPVM: quitosana + extrato de própolis vermelha; Q1,5%: quitosana 1,5% (tratamento adicional – controle).

A partir da microscopia eletrônica de varredura – MEV (Figura 5) é possível investigar características dos filmes através das microestruturas das superfícies e seções transversais e compreender a interação entre as propriedades de barreira e propriedades mecânicas dos filmes (PAIVA *et al.*, 2020).

Figura 5. Micrografias da superfície e sessão transversal de filmes de quitosana 1,5% incorporados com diferentes concentrações de extrato de própolis verde e própolis vermelha.



QPVD: quitosana + extrato de própolis verde; QPVM: quitosana + extrato de própolis vermelha; Q1,5%: quitosana 1,5% (tratamento adicional – controle).

As micrografias dos filmes Q 1,5%, QPVD e QPVM 0,1%, 0,25% mostraram matrizes mais compactadas, homogêneas e sem rachaduras aparentes, nos filmes QPVD e QPVM 0,5%, 1% e 2% nota-se que conforme a concentração de extrato aumentou na formulação a superfície dos filmes se tornou ligeiramente ásperas e rugosas com micro poros e aglomeração de partículas, observadas principalmente nas micrografias da sessão transversal dos filmes, esse comportamento, de acordo com Paiva *et al.* (2020) sugere que houve separação de fases entre os componentes dos filmes.

Observou-se atividade inibitória parcial para *Salmonella Typhimurium* (Tabela 4) em PVD 0,5% e QPVM 0,5% e para *Staphylococcus aureus* em QPVM 1,0% e 2,0%. Os filmes de quitosana combinados com extrato de própolis vermelha se mostraram efetivos na inibição de *Escherichia coli* nas concentrações 0,25%, 0,50% e 1,0%, demonstrando que a combinação de EP com a quitosana potencializou a atividade antimicrobiana frente a esta cepa uma vez que o filme individual de quitosana mostrou-se não ativo para esta cepa.

Tabela 4. Atividade antimicrobiana de extrato de própolis verde e vermelha e revestimentos de quitosana incorporados com diferentes concentrações de extrato de própolis verde e própolis vermelha, Mossoró-RN, 2021.

Concentração (%)	<i>Salmonella Typhimurium</i> (ATCC – 14028)											
	PVD	C	QPVD	C	PVM	C	QPVM	C	Q1,5%	C	AMP 10µg	C
0,12	7,5 ± 0,7	NA	6,7 ± 0,3	NA	*	-	7,5 ± 0,7	NA				
0,25	8,0 ± 1,4	NA	6,7 ± 0,3	NA	7,0 ± 0,0	NA	7,5 ± 0,7	NA				
0,50	9,5 ± 3,5	AP	6,5 ± 0,7	NA	*	-	9,5 ± 3,5	AP	7,7 ± 1,1	NA	23,4	MA
1,00	7,5 ± 0,7	NA	*	-	7,5 ± 0,7	NA	*	-				
2,00	7,0 ± 0,0	NA	*	-	6,7 ± 0,7	NA	*	-				
Concentração (%)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC – 25923)											
	PVD	C	QPVD	C	PVM	C	QPVM	C	Q1,5%	C	CFE 30µg	C
0,12	*	-	7,5 ± 0,7	NA	*	-	6,7 ± 0,4	NA				
0,25	*	-	8,2 ± 2,5	NA	8,0 ± 1,4	NA	7,2 ± 1,1	NA				
0,50	*	-	8,0 ± 1,4	NA	*	-	7,0 ± 0,0	NA	7,5 ± 1,4	NA	22,5	MA
1,00	*	-	7,5 ± 0,7	NA	*	-	9,0 ± 1,4	AP				
2,00	*	-	8,0 ± 1,4	NA	8,0 ± 2,8	NA	11,0 ± 2,8	AP				
Concentração (%)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC – 25922)											
	PVD	C	QPVD	C	PVM	C	QPVM	C	Q1,5%	C	AMP 10µg	C
0,12	*	-	7,5 ± 0,7	NA	6,7 ± 0,4	NA	7,2 ± 1,1	NA				
0,25	*	-	7,5 ± 0,7	NA	9,5 ± 0,7	AP	9,5 ± 0,7	AP				
0,50	*	-	7,0 ± 1,4	NA	*	-	9,0 ± 0,0	AP	6,6 ± 0,2	NA	19,8	MA
1,00	6,7 ± 0,4	NA	8,0 ± 0,0	NA	8,2 ± 2,5	NA	9,0 ± 1,4	AP				
2,00	10,0 ± 4,2	AP	8,5 ± 0,7	NA	6,7 ± 0,4	NA	7,5 ± 0,7	NA				

Resultados apresentados em média ± desvio padrão (n = 2). Medida do halo (mm). *Não houve inibição. PVD: Extrato de própolis verde; PVM: Extrato de própolis vermelha; QPVD: quitosana + extrato de própolis verde; QPVM: quitosana + extrato de própolis vermelha; Q1,5%: quitosana 1,5% (tratamento adicional – controle); C: Classificação; NA: Não Ativo; AP: Atividade Parcial; MA: Muito Ativo; AMP: Ampicilina; CFE: Cefalexina.

Fernandes Júnior *et al.* (1997), observaram em seus estudos que bactérias Gram negativas foram menos susceptíveis ao extrato de própolis do que as bactérias Gram positivas e que a própolis, mesmo em baixas concentrações, é capaz de promover efeito bacteriostático.

Kacaniova *et al.* (2012), ao avaliarem a atividade antimicrobiana de extratos metanólicos e etanólicos de própolis contra bactérias patogênicas, fungos e leveduras encontraram maiores halos de inibição frente a cepas de *E. coli*. Os maiores halos encontrados QPVM podem estar relacionados a sinergia entre a quitosana e os extratos, Al-waili *et al.* (2012) relatam que a atividade sinérgica da própolis associada a diversos antimicrobianos, pode ser uma alternativa natural frente aos microrganismos mais resistentes.

A atividade antimicrobiana dos extratos em baixas concentrações é um ponto positivo uma vez que em altas concentrações o extrato de própolis pode causar alterações na cor e no sabor dos alimentos.

4 CONCLUSÃO

A incorporação do extrato de própolis promoveu aos filmes produzidos melhores resultados nas propriedades de barreira, especialmente solubilidade. Nas propriedades mecânicas, as concentrações mais baixas de EP proporcionaram filmes mais flexíveis, potencializaram a capacidade antimicrobiana da quitosana e se mostrou efetivo na inibição de *Escherichia coli*. A combinação da quitosana com o extrato de própolis pode ser uma opção promissora para elaboração de embalagens ativas.

REFERÊNCIAS

- AHMADI, R.; KALBASI-ASHTARI, A.; OROMIEHIE, A., YARMAND, M-S.; JAHANDIDEH, F. Development and characterization of a novel biodegradable edible film obtained from psyllium seed (*Plantago ovata* Forsk). **Journal of Food Engineering**, n. 109, p. 745–751, 2012.
- AHN, M.-R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1383-1392, 2007.
- ALVES, E.; KUBOTA, E.H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 34(1), p. 37-41, 2013.

AL-WAILI, N.S; AL-GHAMDI, A.; ANSARI, M.J.; AL-ATTAL, Y.; SALOM, K. Synergistic Effects of Honey and Propolis toward Drug Multi-Resistant *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli* and *Candida Albicans* Isolates in Single and Polymicrobial Cultures. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, p. 793-800, 2012.

AMADORI, S.; TORRICELLI, P.; RUBINI, K.; FINI, M.; PANZAVOLTA, S.; BIGI, A. Effect of sterilization and crosslinking on gelatin films. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 2, p. 1–9, 2015.

ATARÉS, L.; CHIRALT, A.; MCELHATTON, A. Use of Edible Coatings, a Novel Preservation Method for Nuts. **Modernization of Traditional Food Processes and Products**, p. 93–101, 2016.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p. 347-363, 1998.

CAMPOS, J. F.; DOS SANTOS, U. P.; MACORINI, L. F. B.; DE MELO, A. M. M. F.; BALESTIERI, J. B. P.; PAREDES-GAMERO, E. J.; DOS SANTOS, E. L. **Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae)**. *Food and Chemical Toxicology*, v. 65, p. 374–380, 2014.

CASARIEGO, A.; SOUZA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; TEIXEIRA, J. A.; CRUS, L.; DÍAZ, R.; VICENTE, A. A. Chitosan/clay films properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles concentrations. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1895–1902, 2009.

CORRÊA, S. J. P.; MENDONÇA, A. B.; COSTA, L. P.; ANDRADE, L. N. T.; LIMA, N. R. S.; RAZZO, D.; RABELO, A. S.; FIGUEIREDO, R. T.; PADILHA, F. F.; CARDOSO, J. C. The use of pectin-based films containing red propolis extract for sunflower seed protection. **Carbohydrate Polymers**, 2011.

DICK, M.; COSTA, T. M. H.; GOMAA, A.; SUBIRADE, M.; RIOS, A. DE O.; FLÔRES, S. H. Edible film production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, n. 130, p. 198–205, 2015.

DWIVEDI, M.; BACKERS, H.; HARISHCHANDRA, R. K.; GALLA, H.-J. Biophysical investigations of the structure and function of the tear fluid lipid layer and the effect of ectoine. Part A: Natural meibomian lipid films. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1838, n. 10, p. 2708–2715, 2014.

FERNANDES JÚNIOR, A.; LOPES, C.A.M.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C. Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 3, p.287-294, 1997.

GE, L.; LI, X.; ZHANG, R.; YANG, T.; YE, X.; LI, D.; MU, C. Development and characterization of dialdehyde xanthan gum crosslinked gelatin based edible films incorporated with amino-functionalized montmorillonite. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 129–135, 2015.

GUTIERREZ-GONÇALVES, M. E. J.; MARCUCCI, M. C. Atividades Antimicrobiana e Antioxidante da Própolis do Estado do Ceará. **Revista Fitus**, v. 4, n. 1, p. 81-86, 2009.

HOQUE, M. S; BENJAKUL, S.; PRODPRANT, T. Proprieties of film from cuttlefish (*Sepia pharaeonis*) skin gelatina incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. **Food hydrocolloids**, Oxford, v. 25, p. 1085-1095, 2011.

HU, Z.; GÄNZLE, M. G. Challenges and opportunities related to the use of chitosan as food preservative. **Journal of Applied Microbiology**, 2018. doi:10.1111/jam.14131

KACANIOVÁ, M., VUKOVIĆ, N., CHLEBO, R., HASCÍK, P., ROVNÁ, K., CUBON, J., DŽUGAN, M.; PASTERNAKIEWICZ, A. The antitmicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. **Archives of Biological Science**, v. 64, p. 927-934, 2012.

LUCHESI, C. L.; FRICK, J. M.; PATZER, V. L.; SPADA, J. C.; TESSARO, I. C. Synthesis and characterization of biofilms using native and modified pinhão starch. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 203–210, 2015.

MEDA A.; LAMIEN C.E.; ROMITO M; MILLOGO J.; NACOULMA O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577, 2005.

MELO, P. T. S.; AOUADA, F. A.; MOURA, M. R. de. Fabricação de filmes bionanocompósitos à base de pectina e polpa de cacau com potencial uso como embalagem para alimentos. **Química Nova**, v. 40, n. 3, p. 247–251, 2017.

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

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

PAIVA, P. H. E. N.; CORREA, L. G.; PAULO, A. F. S.; BALAN, G. C., IDA, E. I.; SHIRAI, M. A. Film production with flaxseed mucilage and polyvinyl alcohol mixtures and evaluation of their properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. xx, p. 1-9, 2020 doi:10.1007/s13197-020-04806-7.

PELISSARI, F. M.; ANDRADE-MAHECHA, M. M.; SOBRAL, P. J. DO A.; MENEGALLI, F. C. Comparative study on the properties of flour and starch films of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 2, p. 681–690, 2013.

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

PIEDRAHÍTA MÁRQUEZ, D. G.; FUENMAYOR, C. A.; SUAREZ MAHECHA, H. Effect of chitosan-propolis edible coatings on stability of refrigerated cachama (*Piaractus*

brachypomus) vacuum-packed fish fillets. **Packaging Technology and Science**, v. 1, n. 11, 2018.

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

ROTTA, J.; MINATTI, E.; BARRETO, P. L.M. Determination of structural and mechanical properties, diffractometry, and thermal analysis of chitosan and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 450-455, abr.-jun. 2011.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

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

SILVA, R.A.; RODRIGUES, A. E.; RIBEIRO, M.C.M.; CUSTÓDIO, A.R.; ANDRADE, N. E.D.; PEREIRA, W.E. Características físicoquímicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1842-1848, 2006.

SILVA, E.C.A. Preparo do extrato de própolis legal. *Mensagem Doce*. v. 70, p. 2-3, 2003.

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. 1-14, 2000.

TALÓN, E.; TRIFKOVIC, K. T.; NEDOVIC, V. A.; BUGARSKI, B. M.; VARGAS, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1153-1161, 2017.

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER, H.A.; BUSCHIAZZO, P.M.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G.R. Antioxidant activity of Paraguayan plants extracts. **Fitoterapia**. Amsterdam, v.74, p. 91-97, 2003.

ZHAO, Y., TEIXEIRA, J. S., GÄNZLE, M. M., & SALDAÑA, M. D. A. Development of antimicrobial films based on cassava starch, chitosan and gallic acid using subcritical water technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 137, p. 101–110, 2018.

CAPÍTULO III

REVESTIMENTO DE QUITOSANA COMBINADO COM EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE NA QUALIDADE DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* RESFRIADO

REVESTIMENTO DE QUITOSANA COMBINADO COM EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE NA QUALIDADE DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* RESFRIADO

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito do revestimento de quitosana combinado com extrato de própolis verde como antioxidante e antimicrobiano natural na qualidade do camarão branco armazenado sob refrigeração. Para isto, foi preparada uma solução de extrato de própolis verde à 0,25%, uma solução de quitosana à 1,5% e uma solução de metabissulfito de sódio à 1,25%. Os camarões foram separados em cinco grupos, grupo controle ou sem tratamento (C), grupo que recebeu aplicação de metabissulfito de sódio (MBS), grupo de revestidos apenas com a solução de quitosana (Q), grupo de revestidos apenas com a solução de extrato de própolis verde (EPVD) e o grupo de revestidos com a solução de quitosana combinada com extrato de própolis verde (QEPVD). Após a aplicação dos tratamentos os camarões foram armazenados sob refrigeração a 4 ± 1 °C por 12 dias. Durante o período de armazenamento foram realizadas análises físico-químicas: pH e TBARS, perda de peso por cocção (PPC), capacidade de retenção de água (CRA), textura; Método Índice de Qualidade (MIQ) e análises as microbiológicas. Os resultados desse estudo indicaram que houve um efeito sinérgico entre a quitosana e o EPVD, uma vez que os camarões tratados com o revestimento QEPVD, apresentaram melhores escores nos atributos sensoriais avaliados pelo MIQ, bem como relacionados ao desenvolvimento de melanose. Além disso, os valores de pH foram mantidos e houve redução nos teores de TBARS, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para CRA, PPC já a cor e textura foram significativamente melhoradas. Houve diminuição significativa ($p < 0,05$) na contagem total de mesófilos e redução nas contagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* nos grupos Q, EPVD e QEPVD. Assim, estes resultados demonstram que o revestimento de quitosana combinado com o extrato de própolis verde pode ser utilizado como uma alternativa aos agentes antimelanóticos e antioxidantes sintéticos, retardando o desenvolvimento da melanose e microrganismos, melhorando assim, a qualidade do camarão resfriado.

Palavras-chave: Antimicrobiano natural, antioxidante natural, melanose, pescado, qualidade do pescado.

CHITOSAN COATING COMBINED WITH GREEN PROPOLIS EXTRACT IN THE QUALITY OF SHRIMP *Litopenaeus vannamei* COOLED

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of chitosan coating combined with green propolis extract as an antioxidant and natural antimicrobial on the quality of white shrimp stored under refrigeration. For this, a 0.25% green propolis extract solution, a 1.5% chitosan solution and a 1.25% sodium metabisulfite solution were prepared. The prawns were separated into five groups, control or untreated group (C), group that received application of sodium metabisulfite (MBS), group of coated only with the chitosan solution (Q), group of coated only with the solution of green propolis extract (EPVD) and the group of coated with the chitosan solution combined with green propolis extract (QEPVD). After applying the treatments, the shrimp were stored under refrigeration at 4 ± 1 °C for 12 days. During the storage period, physical-chemical analyzes were performed: pH and TBARS, cooking weight loss (PPC), water retention capacity (CRA), texture; Quality Index Method (MIQ) and microbiological analyzes. The results of this study indicated that there was a synergistic effect between chitosan and EPVD, since the shrimp treated with the QEPVD coating, showed better scores on the sensory attributes evaluated by MIQ, as well as related to the development of melanosis. In addition, the pH values were maintained and there was a reduction in TBARS levels, there was no significant difference ($p > 0.05$) for CRA, PPC and the color and texture were significantly improved. There was a significant decrease ($p < 0.05$) in the total mesophilic count and a reduction in the *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* counts in the Q, EPVD and QEPVD groups. Thus, these results demonstrate that the chitosan coating combined with the green propolis extract can be used as an alternative to antimelanotic agents and synthetic antioxidants, delaying the development of melanosis and microorganisms, thus improving the quality of the chilled shrimp.

Keywords: Natural antimicrobial, natural antioxidant, melanosis, fish, fish quality.

1 INTRODUÇÃO

O camarão se destaca mundialmente por ser um alimento de alto valor comercial e por possuir características nutricionais e sensoriais muito apreciadas. Comumente conhecido como camarão branco do Pacífico, o *Litopenaus vannamei* tem como origem a costa do Pacífico no México, mas é amplamente cultivado em diversos países (YUAN *et al.*, 2016a) e de grande importância econômica no Nordeste do Brasil (ROCHA, 2004).

Apesar do sabor e textura singular o camarão é um alimento de vida útil curta, a rápida deterioração se deve às características intrínsecas da espécie que podem desencadear alterações de origem bioquímica, microbiológica ou física durante o processamento e estocagem (ALOTAIBI; TAHERGORABI, 2018).

Um dos problemas mais comuns enfrentados pela cadeia produtiva do camarão ocorre logo após a despesca ou captura, quando se inicia o processo de melanogênese, popularmente conhecido por melanose, ou *black spot*, cujas as manchas escuras causam escurecimento progressivo nas articulações e no exoesqueleto dos crustáceos (SENAPATI *et al.*, 2017) pela ação da enzima polifenoloxidase.

O impacto da melanose não está relacionado à saúde do consumidor, mas sim ao impacto nos atributos sensoriais do crustáceo, devido à cor e aparência desagradável, dessa forma, afeta a aceitabilidade e vida útil do camarão gerando impacto econômico negativo (MONTERO *et al.*, 2001).

Para inibir o desenvolvimento da melanose são empregados aditivos (redutores) sintéticos tais como sulfitos e ácido ascórbico, sendo o metabissulfito de sódio o mais utilizado. No entanto, há uma preocupação quanto ao uso dessas substâncias, pois os sulfitos usados como agente antioxidantes e antimicrobianos por exemplo, quando administrados em excesso podem causar reações tóxicas em indivíduos sensíveis e alterações sensoriais que comprometem a qualidade final do produto (FURLAN, 2011).

A quitosana tem sido amplamente utilizada em filmes e revestimentos para conservar alimentos, incluindo pescado, muito já se sabe sobre a capacidade antimicrobiana da quitosana, suas propriedades de formação de filmes e biocompatibilidade (BERIZI *et al.*, 2018) que favorecem o desenvolvimento de revestimentos combinados com conservantes de origem vegetal por exemplo.

O extrato de própolis por sua vez, destaca-se por possuir ampla atividade antimicrobiana e propriedades antioxidante atribuídas aos seus compostos químicos como os polifenóis, os flavonoides e os ácidos fenólicos (DUMAN e OZPOLAT, 2015) características que podem ser

exploradas para conservar e prolongar a vida de prateleira dos alimentos (ALVES e KLUBOTA, 2013).

Considerando a segurança alimentar e as exigências dos consumidores no contexto de mercado atual, a utilização de compostos naturais como a quitosana e os extratos vegetais em revestimentos bioativos como alternativa ao uso de aditivos sintéticos surge como aposta para otimizar processos antigos, prolongar a vida de prateleira e agregar valor ao pescado mantendo a qualidade nutricional mais próxima do natural.

Diante do exposto, objetivou-se com esse estudo avaliar a eficiência do revestimento de quitosana combinado com extratos das própolis verde na qualidade do camarão branco *L. vannamei* resfriado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Soluções de revestimento

Para a preparação da solução de metabissulfito de sódio (MBS) 1,25%, o metabissulfito foi dissolvido e diluído em água destilada na proporção 1 : 2 (p / v). A solução de extrato de própolis verde (EPVD) 0,25% foi preparada por diluição do extrato em água destilada. A solução foi mantida sob agitação durante 1 h, à temperatura ambiente. O revestimento de quitosana (Q) e o revestimento de Q 1,5% combinado com EPVD 0,25% (QEPVD) foram preparados conforme já citado no Capítulo II.

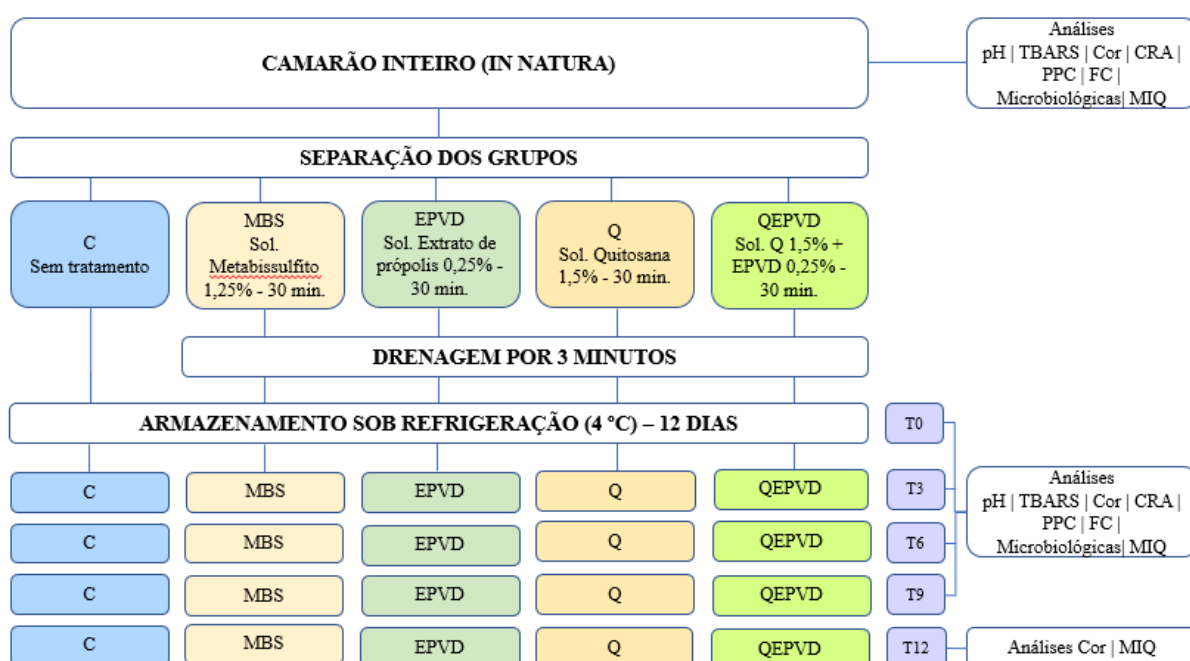
2.2 Coleta e tratamento dos camarões

Os camarões (*Litopenaeus vannamei*) foram adquiridos em uma fazenda no município de Mossoró, Rio Grande do Norte. Logo após a despesca foram acondicionados em caixa isotérmica contendo gelo na proporção 1:1 e transportados imediatamente para o Laboratório de Análises Instrumentais e Sensoriais - LANIS da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Foram lavados e separados aleatoriamente em cinco grupos. O grupo C não recebeu nenhum tipo de tratamento, o grupo MBS foi imerso em uma solução de 1,25% de metabissulfito, o grupo EPVD foi imerso em 0,25% de Extrato de própolis verde, o grupo Q foi imerso em solução de 1,5% de quitosana e o grupo QEPVD foi imerso na solução de 1,5% de quitosana e 0,25% de Extrato de própolis, na proporção 1 : 2 (camarão/solução), por 30 minutos,

respectivamente, e drenados por 3 minutos à temperatura ambiente, conforme o fluxograma de planejamento experimental (Figura 1).

As amostras de cada grupo foram acondicionadas em embalagens plásticas hermeticamente fechadas, sendo uma para cada dia de análise, totalizando 10 amostras por grupo, 5 para análises microbiológicas e 5 para físico-químicas e armazenadas em refrigeração a 4 ± 1 °C, por 12 dias. Todo processo obedeceu às normas de boas práticas de manipulação de pescado (BRASIL, 2004).

Figura 1. Fluxograma do planejamento experimental



2.3 Método Índice de Qualidade - MIQ

Para o MIQ foi utilizado o esquema desenvolvido por Gonçalves *et al.* (2015) (Tabela 1), conduzido por cinco avaliadores treinados previamente. As amostras foram avaliadas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12, os parâmetros avaliados foram: aroma, presença de melanose, textura, aderência da cabeça, aderência da carapaça e aparência geral. Com pontos de demérito variando de 0 – 36 que somados representam o Índice de Qualidade (IQ) das amostras avaliadas. O índice de Melanose (IM) foi dado pela soma dos pontos de demérito de cada amostra para esta categoria. As avaliações aconteceram no mesmo horário e local em todos os tempos durante todo o período do experimento.

Tabela 1. Esquema de MIQ utilizado para avaliar qualidade do camarão

Parâmetro de Qualidade	Descrição	Escore
Aroma	Fresco, suave de algas marinhas	0
	Fresco, lembrando o mar (maresia)	2
	Amoniacal fraco	4
	Amoniacal forte, pútrido	6
Melanose	Ausente	0
	Pouca, pequenos pontos pretos isolados, presentes em até 50% dos camarões da amostra	2
	Moderada, pequenos pontos pretos isolados, presentes em mais de 50% dos camarões da amostra	4
	Moderada, manchas pretas presentes em até 50% dos camarões da amostra	6
	Muita, manchas pretas presentes em mais de 50% dos camarões da amostra	8
	Muita, manchas pretas presentes em 100% dos camarões da amostra	10
Textura	Normal	0
	Amolecida	2
Aderência da Carapaça	Fortemente aderida	0
	Aderência média	2
	Aderência fraca	4
Aderência da cabeça ao corpo	Fortemente aderida	0
	Aderência média	2
	Aderência fraca	4
Aparência Geral	Excelente	0
	Ótima	2
	Boa	4
	Ruim	6
	Péssima	8
	Inaceitável	10
Índice de Qualidade (IQ)		0 - 36

Fonte: Gonçalves *et al.* (2015)

2.4 Análises físico-químicas

2.4.1 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH das amostras foi determinado de acordo com a metodologia estabelecida pelo AOAC (2016) com auxílio de um medidor de pH da marca Tecnal modelo R-TEC-7 devidamente calibrado.

2.4.2 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Para o teste de TBARS, foi utilizado 0,5 g de camarão previamente macerado, com adição da solução estoque (ácido tiobarbitúrico a 0,375%, ácido tricloroacético a 15% e HCl a 0,25 mol.L⁻¹) e quando positivas as amostras desenvolvem a cor rosa durante o aquecimento. A absorbância da solução foi determinada em 532nm contra o branco. A quantidade de TBARS foi expressa em miligramas de malonaldeído por kg de camarão (AMSA, 2012).

2.4.3 Capacidade de Retenção de Água (CRA)

A CRA foi determinada de acordo com metodologia descrita por Hamm (1960) que se baseia na medição da perda de água liberada pela amostra quando submetida a uma pressão sobre o tecido muscular. A quantidade de água livre da amostra foi obtida pela diferença entre o peso inicial e final expressa em porcentagem de peso perdido da amostra inicial.

2.4.4 Perda de Peso por Cocção (PPC)

Para determinação da PPC as amostras foram pesadas e submetidas à cocção em *grill*, onde a temperatura interna do músculo ficou em torno de 75°C, após isto, as amostras foram retiradas do *grill* e pesadas novamente. O resultado foi dado em porcentagem de perda de água durante o processo térmico (OSÓRIO *et al.*, 1998).

2.4.5 Força de Cisalhamento (FC)

A força de cisalhamento foi mensurada por meio de um TEXTURE ANALYZER TA-XT-125, acoplado ao dispositivo Warner-Bratzler, o qual expressa a força em kgf/cm² (HAMM, 1960).

As análises acima citadas foram realizadas em triplicata aos 0, 3, 6 e 9 dias de armazenamento.

2.4.6 Cor

A cor foi avaliada aos 0, 3, 6, 9 e 12 dias, através do colorímetro Konica Minolta, CM-700d/600d (Sistema CIE L*a*b*), cujo sistema considera as coordenadas: L* (luminosidade), que representa a luminosidade em uma escala de 0 (preto) a 100 (branco); a* (teor de vermelho), que varia de valores negativos para tons de verde a positivos para vermelho; e b* (teor de

amarelo), que varia de valores negativos para azul e valores positivos para amarelo (ZHANG *et al.*, 2015).

2.5 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas nos dias 0, 3, 6 e 9 de armazenamento refrigerado a 4 ± 1 °C. Foram previamente pesadas 25g da amostra de forma asséptica e transferidas para sacos plásticos estéreis, acrescidos com 225 mL de água peptonada tamponada estéril e posteriormente homogeneizados em “Stomacher” por 2 minutos, obtendo assim a diluição 10^{-1} , a partir da qual foram obtidas as demais diluições até 10^{-4} . Concluídas as diluições, as amostras foram submetidas às técnicas para determinação da presença de *Salmonella* spp. no tempo inicial do experimento, contagem de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (BRASIL, 2017) nos tempos inicial e final. Também foram realizadas a contagem total de psicrótroficas e de bactérias aeróbias mesófilas a cada três dias durante nove dias de experimento utilizando a metodologia recomenda pela American Public Health Association (DOWNES; ITO 2001).

2.6 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. As médias foram agrupadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados foram analisados utilizando o software estatístico R.

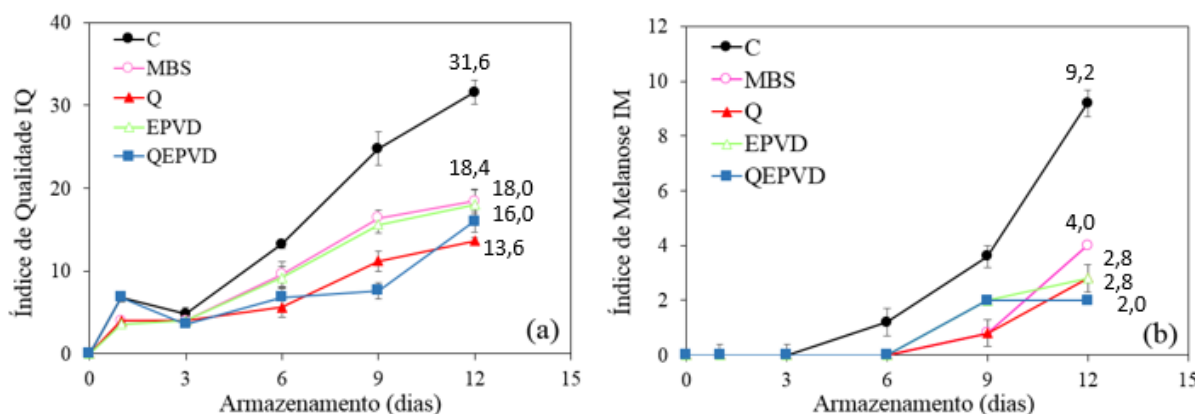
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Índice de Qualidade (IQ) utilizado para medir a vida útil do camarão indicou perda significativa ($p < 0,05$) de qualidade a partir do sexto dia de armazenamento (Figura 2-A), o grupo controle apresentou maiores escores em todo o período de armazenamento com perda acentuada no nono dia. O Índice de Melanose – IM (Figura 2-B) demonstra que o início do desenvolvimento da melanose se deu a partir do sexto dia no grupo controle enquanto que nos demais grupos as manchas escuras foram observadas somente a partir do nono dia.

A perda de qualidade sensorial e o desenvolvimento de melanose foram inibidos significativamente nos tratamentos Q, EPVD e QEPVD em comparação com o grupo C (Figura

2). O escore médio de IQ e IM aos 12 dias de armazenamento no grupo C foi de 31,6 e 9,2, enquanto que, no grupo QEPVD foi de 16,0 e 2,0 respectivamente.

Figura 2. Escores de A - Índice de Qualidade (IQ) e B - Índice de Melanose (IM) do camarão branco (*L. vannamei*) durante 12 dias de armazenamento resfriado 4 ± 1 °C.



Dados relatados como média $\pm$ erro padrão. C: grupo controle; MBS: grupo metabisulfito; Q: grupo quitosana; EPVD: grupo extrato de própolis verde e QEPVD: grupo de quitosana combinada com extrato de própolis verde.

Os resultados encontrados a partir do MIQ revelam que as amostras tratadas com quitosana e extrato de própolis verde se mantiveram com qualidade aceitável por mais tempo. Estes resultados sugerem que as propriedades biológicas presentes na quitosana que atuam como antioxidante e antimicrobiano e a capacidade de formação de barreira ao oxigênio (BERIZI *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2012), combinadas aos compostos fenólicos presentes no extrato de própolis verde (DUMAN; OZPOLAT, 2015), foram eficazes na manutenção da qualidade sensorial do camarão resfriado inibindo a ação das enzimas polifenoloxidase e dos microrganismos responsáveis pela deterioração do camarão.

O pH do camarão fresco no início do experimento foi de 6,65 (Tabela 2) com diferença significativa ($p < 0,05$) ao longo dos dias de armazenamento e entre os tratamentos. No geral, o camarão tratado com a combinação de quitosana e extrato de própolis apresentou valores médios entre 6,65 e 6,95 enquanto que o controle variou de 6,65 a 7,32, demonstrando que o aumento no pH foi significativamente inibido com o tratamento de quitosana combinado com extrato de própolis.

A legislação brasileira determina que o pH ideal para camarão resfriado deve ser inferior a 7,85 (BRASIL, 2019b). Goswami *et al.* (2001), relatam que valores de pH em torno de 7,2 indica boa qualidade enquanto que pH entre 7,7 e 7,95 indica baixa de qualidade.

Todas as amostras mantiveram-se dentro dos limites aceitáveis de pH, no entanto, os resultados de pH encontrados no tratamento QEPVD indicam que a combinação da quitosana com o extrato de própolis verde pode agir retardando a deterioração do camarão uma vez que segundo Lopez-Caballero *et al.* (2007), o pH atua como variável chave para o desenvolvimento de microrganismos e ação enzimática.

Tabela 2. Valores médios de pH e TBARS das amostras de camarão (*L. vannamei*) resfriado submetidas a diferentes tratamentos durante 9 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.

Variável	Dias	Tratamentos									
		C		MBS		Q		EPVD		QEPVD	
pH	0	6,65±0,05	aC	6,65±0,05	aB	6,65±0,05	aB	6,65±0,05	aC	6,65±0,05	aC
	3	7,13±0,07	abcB	7,39±0,12	aA	7,05±0,13	bcA	7,27±0,04	abAB	6,92±0,06	cB
	6	7,53±0,07	aA	7,14±0,13	bA	7,19±0,23	bA	7,07±0,09	bB	7,2±0,34	bA
	9	7,32±0,12	abAB	7,40±0,09	abA	7,12±0,02	bcA	7,44±0,19	aA	6,95±0,2	cAB
TBARS	0	0,09±0,01	aC	0,09±0,01	aC	0,09±0,01	aC	0,09±0,01	aB	0,09±0,01	aB
	3	0,08±0,00	bC	0,07±0,01	bC	0,11±0,02	aB	0,07±0,00	bB	0,05±0,01	cC
	6	0,13±0,01	aB	0,13±0,00	aB	0,15±0,01	aA	0,12±0,00	aA	0,13±0,00	aA
	9	0,22±0,01	aA	0,18±0,00	bA	0,11±0,00	cB	0,09±0,00	dB	0,12±0,00	cA

Dados relatados como média ± desvio padrão. Mesma letra, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem estaticamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). C: grupo controle; MBS: grupo metabissulfito; Q: grupo quitosana; EPVD: grupo extrato de própolis verde e QEPVD: grupo de quitosana combinada com extrato de própolis verde.

A análise de TBRAS é comumente utilizada para avaliar o grau de oxidação lipídica em alimentos (BOONSUMREJ *et al.*, 2007), no entanto, a legislação brasileira não contempla limite máximo para teor de malonaldeído em produtos cárneos.

Os valores de TBARS expressos na Tabela 2 demonstram que houve influência significativa ($p < 0,05$) do tempo de armazenamento e dos tratamentos. Segundo Cadun *et al.* (2005), o valor de TBARS em camarão de boa qualidade deve estar em torno de 3,0 mg de malonaldeído/kg, não devendo ultrapassar 5,0 mg de malonaldeído/kg. Embora os valores encontrados, tanto nas amostras tratadas quanto nas amostras controle, não tenham ultrapassado 3mg de malonaldeído, fica evidente que houve menos oxidação ao longo dos nove dias de armazenamento nas amostras tratadas com extrato de própolis verde e também nas amostradas tratadas com a combinação de quitosana e extrato de própolis verde demonstrando que houve inibição da oxidação lipídica nessas amostras. Portanto, é possível sugerir que a incorporação do extrato de própolis verde potencializou a capacidade antioxidante da quitosana.

A Tabela 3 mostra os resultados da variável CRA, sendo possível observar que os grupos Q e QEPVD apresentaram melhores resultados. Queiroga *et al.* (2014) relatam que alimentos com maior capacidade de retenção de água tendem a perder menos peso durante o

armazenamento e Moreno *et al.* (2008) ressaltam que uma baixa CRA pode interferir no valor nutritivo do alimento através do líquido perdido, além de interferir no rendimento da carne. Os resultados encontrados no grupo QEPVD demonstram que a quitosana combinada com o extrato de própolis verde foi eficiente na manutenção da capacidade de retenção de água no camarão já que este tratamento promoveu menores perdas de umidade.

Tabela 3. Valores médios de CRA das amostras de camarão (*L. vannamei*) resfriado submetidas a diferentes tratamentos durante 9 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.

Variável	Dias	Tratamentos									
		C		MBS		Q		EPVD		QEPVD	
CRA (%)	0	71,52±3,7	aA	71,52±3,7	aA	71,52±3,7	aA	71,52±3,7	aA	71,52±3,7	aA
	3	56,66±7,4	bcB	56,00±5,3	cB	73,10±6,4	aA	70,69±9,6	abA	63,88±2,0	abcA
	6	60,26±0,6	abAB	69,64±5,1	abA	68,94±2,0	abA	56,33±3,3	bB	70,72±7,1	aA
	9	65,57±7,1	aAB	64,79±12,3	aAB	72,57±9,2	aA	65,56±8,9	aAB	76,00±4,0	aA

Dados relatados como média ± desvio padrão. Mesma letra, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem estaticamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). C: grupo controle; MBS: grupo metabissulfito; Q: grupo quitosana; EPVD: grupo extrato de própolis verde e QEPVD: grupo de quitosana combinada com extrato de própolis verde.

Quanto à perda de peso por cocção (Tabela 4) não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) tanto entre os tratamentos quanto ao longo do período de armazenamento. A perda de peso por cocção é influenciada pela capacidade de retenção de água, Wu e Sun (2013) relatam que quanto maior a CRA menor será a PPC, no entanto, Freire *et al.* (2016) observaram que quando acontece maiores perda de peso por cocção mesmo havendo um aumento na capacidade retenção, possivelmente, essas perdas estão relacionadas a perdas de gordura e não a perdas de umidade.

Tabela 4. Valores médios de PPC das amostras de camarão (*L. vannamei*) resfriado submetidas a diferentes tratamentos durante 9 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.

Variável	Dias	Tratamentos				
		C	MBS	Q	EPVD	QEPVD
PPC (%)	0	51,00±9,58	51,00±9,58	51,00±9,58	51,00±9,58	51,00±9,58
	3	56,89±0,97	52,89±1,82	53,24±1,82	54,30±1,65	53,34±0,92
	6	55,06±0,77	57,04±0,73	51,00±0,84	56,51±0,11	52,97±0,97
	9	56,34±1,42	55,91±0,92	52,76±1,42	54,98±0,40	55,45±1,52

Dados relatados como média ± desvio padrão. C: grupo controle; MBS: grupo metabissulfito; Q: grupo quitosana; EPVD: grupo extrato de própolis verde e QEPVD: grupo de quitosana combinada com extrato de própolis verde.

Como as diferenças entre o grupo controle e os demais grupos de tratamento não foram significativas para a variável PPC pode-se sugerir que os tratamentos não interferiram ou

causaram prejuízos relacionados a perda de peso por cocção, podendo ser considerado um bom resultado uma vez que esta variável assim como a CRA interfere diretamente no rendimento da carne no momento do consumo (PARDI *et al.*, 1993).

Com relação à textura, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 5) podendo ser observada redução significativa na textura do camarão em todos os tratamentos durante todo o período de armazenamento. O grupo controle apresentou maiores perdas entre os tempos inicial e final de armazenamento (1,21 a 0,66), melhores resultados foram encontrados no grupo tratado com quitosana (1,21 a 0,80) e no grupo tratado com quitosana combinado com extrato de própolis verde (1,21 a 0,87).

Estes resultados podem estar associados à perda de qualidade do camarão e consequente perda de textura ou flacidez do músculo. No entanto, os melhores resultados observados nos grupos Q e QEPVD neste estudo corroboram com Yuan *et al.* (2016 b), quando afirmam que melhores resultados nas propriedades de textura podem estar relacionadas com as ligações entre a quitosana e as proteínas miofibrilares.

Tabela 5. Valores médios de textura das amostras de camarão (*L. vannamei*) resfriado submetidas a diferentes tratamentos durante 9 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.

Variável	Dias	Tratamentos									
		C		MBS		Q		EPVD		QEPVD	
Textura (kgf/cm ²)	0	1,21±0,11	aA	1,21±0,11	aA	1,21±0,11	aA	1,21±0,11	aA	1,21±0,11	aA
	3	0,78±0,06	abB	0,69±0,15	bB	0,87±0,14	abB	0,91±0,16	abB	0,97±0,23	aAB
	6	0,68±0,15	abB	0,59±0,06	bB	0,86±0,04	aB	0,76±0,11	abBC	0,65±0,02	abC
	9	0,66±0,00	abB	0,59±0,06	bB	0,80±0,16	abB	0,57±0,05	bC	0,87±0,01	aBC

Dados relatados como média ± desvio padrão. Mesma letra, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem estaticamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). C: grupo controle; MBS: grupo metabissulfito; Q: grupo quitosana; EPVD: grupo extrato de própolis verde e QEPVD: grupo de quitosana combinada com extrato de própolis verde.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos valores de L* (Tabela 6) entre nos tratamentos, no entanto, os valores de L* no grupo controle diminuíram a partir do sexto dia coincidindo com o aumento nos scores de melanose. O parâmetro L* está relacionado ao frescor e ao desenvolvimento de melanose, logo, quanto menor o valor L* mais acentuado será o desenvolvimento da melanose.

Com relação aos parâmetros a* e b* foi observada diferença significativa a partir do sexto dia de armazenamento.

A cor é um atributo importante na determinação de qualidade de alimentos, especialmente para o consumidor. Senapati *et al.* (2017), destacam que a análise de cor

instrumental é normalmente utilizada como uma informação de suporte para avaliação do grau de desenvolvimento da melanose e qualidade sensorial do camarão.

Tabela 6. Valores médios de cor (L^* a^* b^*) das amostras de camarão (*L. vannamei*) resfriado submetidas a diferentes tratamentos durante 9 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.

Variável	Dias	Tratamentos									
		C		MBS		Q		EPVD		QEPVD	
L^*	0	65,64±1,6	aA	65,64±1,6	aA	65,64±1,6	aAB	65,64±1,6	aA	65,64±1,6	aA
	3	68,35±1,4	aA	69,03±0,7	aA	67,11±1,1	aA	69,59±1,0	aA	69,11±0,0	aA
	6	66,75±0,8	aA	70,59±0,7	aA	68,04±35,3	aA	69,09±1,6	aA	67,90±0,9	aA
	9	66,09±0,8	bA	66,72±0,7	aA	63,31±0,1	aAB	64,09±0,8	aA	67,10±1,1	aA
	12	64,37±1,6	aA	65,92±1,4	aA	67,92±2,1	aA	67,00±1,9	aA	67,73±1,9	aA
a^*	0	0,93±0,3	aB	0,93±0,3	aBC	0,93±0,3	aB	0,93±0,3	aAB	0,93±0,3	aAB
	3	0,94±0,3	aB	0,39±0,2	aC	1,00±0,4	aB	0,42±0,0	aB	0,43±0,2	aB
	6	1,58±0,2	aAB	1,09±0,4	aABC	0,96±0,7	aB	1,52±0,3	aA	1,59±0,8	aA
	9	1,35±0,2	bAB	1,34±0,2	bAB	2,37±0,1	aA	1,44±0,0	bA	1,20±0,3	bAB
	12	1,99±0,3	aA	1,79±0,5	aA	1,42±0,3	aB	1,54±0,2	aA	1,35±0,1	aA
b^*	0	8,92±0,5	aAB	8,92±0,5	aAB	8,92±0,5	aAB	8,92±0,5	aABC	8,92±0,5	aA
	3	7,47±1,3	aB	8,18±1,7	aBC	7,99±1,3	aB	7,08±0,9	aC	9,24±1,6	aA
	6	10,26±1,1	aA	6,32±0,3	bC	7,45±0,5	bB	7,58±0,9	bBC	8,43±1,5	abA
	9	8,88±0,3	aAB	8,95±1,5	aAB	9,39±0,2	aAB	9,5±0,3	aAB	9,63±1,0	aA
	12	9,81±1,5	aAB	11,14±0,7	aA	10,38±2,1	aA	10,67±0,5	aA	10,26±1,0	aA

Dados relatados como média $\pm$ desvio padrão. Mesma letra, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem estaticamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). C: grupo controle; MBS: grupo metabissulfito; Q: grupo quitosana; EPVD: grupo extrato de própolis verde e QEPVD: grupo de quitosana combinada com extrato de própolis verde.

Os resultados da análise instrumental de cor mostram que o extrato de própolis utilizado, tanto isoladamente quanto em combinação com a quitosana, não promoveu alterações de cor nas amostras tratadas. Portanto, as alterações no atributo cor pode estar associadas à perda de qualidade do camarão.

Os resultados obtidos na contagem total de placas de aeróbicas mesófilas (Tabela 7) mostram o crescimento de microrganismos no grupo controle durante o período de armazenamento acompanhado do grupo tratado com metabissulfito que no sexto dia apresentou um pico de crescimento e no último dia de experimento apresentou uma redução. Os grupos Q e QEPVD apresentaram redução na contagem total de placas não havendo diferença significativa entre os grupos Q, EPVD e QEPVD no último tempo de experimento.

Tabela 7. Contagem total de placas aeróbicas mesófilas de camarão (*L. vannamei*) resfriado submetido a diferentes tratamentos durante 9 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.

Dias		Tratamentos									
		C		MBS		Q		EPVD		QEPVD	
Mesófilos log UFC/g	0	3,75 ± 0,10	aA	3,75 ± 0,10	aA	3,75 ± 0,10	aA	3,75 ± 0,10	aA	3,75 ± 0,10	aA
	3	5,15 ± 0,05	aA	4,37 ± 0,14	abA	1,83 ± 0,31	bA	3,15 ± 0,13	abA	2,53 ± 0,67	abA
	6	5,40 ± 0,05	aA	5,42 ± 0,03	aA	1,53 ± 0,55	bA	3,38 ± 0,10	abA	1,65 ± 0,30	bA
	9	5,22 ± 0,13	aA	4,08 ± 1,93	abA	1,60 ± 0,10	bA	1,40 ± 0,17	bA	1,63 ± 0,06	bA
Dados relatados como média ± desvio padrão. Mesma letra, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem estaticamente de acordo com o teste de Tukey (p < 0,05). C: grupo controle; MBS: grupo metabissulfito; Q: grupo quitosana; EPVD: grupo extrato de própolis verde e QEPVD: grupo de quitosana combinada com extrato de própolis verde.											

Os resultados mostram que houve redução no crescimento de microrganismos nos grupos tratados individualmente com quitosana e extrato de própolis verde e também com o revestimento de quitosana combinado com o extrato de própolis verde.

Duman e Ozpolat (2015) observaram em seus estudos que a aplicação de extrato de própolis em filés de peixe resfriados reduziu a contaminação microbiana ao longo do tempo de armazenamento embora outros autores tenham sugerido que o extrato de própolis atua como bacteriostático ou inibidor significativo de microrganismos patogênicos e deteriorantes e não como bactericida.

Berizi *et al.* (2018), relatam que apesar dos muitos estudos comprovando o potencial antimicrobiano da quitosana, o mecanismo exato responsável pela diminuição do crescimento de microrganismos é controverso. O que se sabe é que a quitosana atua de diversas formas para induzir sua atividade antimicrobiana.

Sun *et al.* (2017) ao estudarem as atividades bioativas de revestimentos de quitosana combinado com polifenóis constataram que a incorporação dos polifenóis à quitosana potencializa os resultados quando comparados a revestimentos compostos somente por quitosana.

Além da contagem total de placas de aeróbicas mesófilas foi realizada a pesquisa por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., (Tabela 8) os resultados obtidos no início do experimento mostraram que todas as amostras estavam dentro dos padrões da IN nº 60, de dezembro de 2019 que regulamenta os padrões de qualidade para camarão (BRASIL, 2019). Ao final dos nove dias de experimento o grupo controle apresentou valor (3,20), acima do que preconiza a legislação brasileira para *S. aureus*, sendo, portanto, impróprio para consumo.

Tabela 8. Pesquisa por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em camarão (*L. vannamei*) resfriado submetido a diferentes tratamentos durante 9 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.

Microrganismos	Tempo	Tratamentos					Padrão (BRASIL, 2019)
		C	MBS	Q	EPVD	QEPVD	
<i>Salmonella</i> spp.	T0	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausência
	T9	-	-	-	-	-	
<i>Staphylococcus aureus</i>	T0	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	3,0
	T9	3,20	2,50	0,0	0,0	0,0	
<i>Escherichia coli</i>	T0	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,70
	T9	2,25	0,0	0,0	0,0	0,0	

Resultados expressos em Log UFC/g. C: grupo controle; MBS: grupo metabissulfito; Q: grupo quitosana; EPVD: grupo extrato de própolis verde e QEPVD: Grupo de quitosana combinada com extrato de própolis verde.

O camarão foi levado para laboratório imediatamente após a despesca, havendo o mínimo de manipulação durante o processo de aplicação dos revestimentos, além de serem tomadas as medidas de higiene necessárias para manipulação dos mesmos conforme Brasil (2004).

O início da deterioração e crescimento de microrganismos patogênicos determinam a qualidade e a vida de prateleira dos alimentos, nesse sentido, os resultados apresentados nas Tabelas 7 e 8 demonstram que os tratamentos Q, EPVD e QEPVD apresentaram resultados satisfatórios quando comparados com o grupo controle e MBS sugerindo que o uso do extrato de própolis verde individualmente ou em combinação com a quitosana pode ampliar a vida de prateleira do camarão resfriado.

Os resultados obtidos no grupo Q, EPVD e QEPVD podem ser atribuídos aos cuidados com a manipulação do camarão e à ampla capacidade antimicrobiana da quitosana (CHUNG; CHEIN, 2008) em combinação com o extrato de própolis verde e seus compostos fenólicos responsáveis pela atividade antimicrobiana (GÓMEZ-CARAVACA *et al.*, 2006) no camarão resfriado. Esses resultados podem sugerir ainda que houve sinergismo entre a quitosana e o extrato de própolis verde na atividade antimicrobiana.

4 CONCLUSÃO

A quitosana combinada com extrato de própolis verde retardou o desenvolvimento da melanose, manteve a qualidade sensorial por mais tempo, inibiu a ação de microrganismos, promoveu a diminuição do TBARS e a manutenção do pH, sugerindo que o revestimento de

quitosana combinado com extrato de própolis verde pode ser utilizado como uma alternativa natural eficaz aos conservantes sintéticos para inibir a melanose e melhorar a qualidade do camarão resfriado promovendo a ampliação da vida de prateleira e maior segurança para consumidores, manipuladores e para o ambiente.

REFERÊNCIAS

ALOTAIBI, S.; TAHERGORABI, R. Development of a sweet potato starch-based coating and its effect on quality attributes of shrimp during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 88, p. 203–209, 2018.

ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 37-41, 2013.

AMSA. Meat color measurement guidelines. **American Meat Science Association**. USA, v. 2, p. 100-101, 2012.

AOAC Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis (20th ed.). Rockville, USA, AOAC International, 2016.

BERIZI, E.; HOSSEINZADEH, S.; SHEKARFOROUSH, S. S.; BARBIERI, G. Microbial, chemical, textural and sensory properties of coated rainbow trout by chitosan combined with pomegranate peel extract during frozen storage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 1004–1013, 2018.

BOONSUMREJ, S.; CHAIWANICH SIRI, S.; TANTRATIAN, S.; SUZUKI, T.; TAKAI, R. Effects of freezing and thawing on the quality changes of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) frozen by air-blast and cryogenic freezing. **Journal of Food Engineering**, n. 80, p. 292–299, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RCD nº 216, de 15 de setembro de 2004: Legislação de boas práticas para serviços de alimentação. Brasília, 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/bps.htm>. Acesso em: 11 fev 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Instrução Normativa nº 60 de 23 de dezembro de 2019. Estabelece a lista de padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União** nº 249, Brasília, DF, 26 dez, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal** - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária., Brasília, DF, 2017.

CADUN, A.; CAKLI, S.; KISLA, D. A study of marination of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*, Lucas, 1846) and its shelf life. **Food Chemistry**, v. 90(1-2), p. 53–59, 2005.

CHUNG, Y. C.; CHEN, C. Y. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. **Bioresource Technology**, 99, 2806–2814, 2008.

DOWNES, F. P.; ITO, H. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. **American Public Health Association**, Washington, 4 ed. 676, 2001.

DUMAN, M.; ÖZPOLAT, E. Effects of water extract of propolis on fresh shibuta (*Barbus grypus*) fillets during chilled storage. **Food Chemistry**, v. 189, p. 80–85. 2015.

FREIRE, B. C. F.; SOARES, K. M. P.; COSTA, A. C. A. A.; SOUZA, A. S.; SILVA, L. K. C.; GÓIS, V. A.; BEZERRA, A. C. D. S.; GOMES, H. A. N. Qualidade de camarão (*Litopenaeus vannamei*) minimamente processado. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 10, n. 2, p. 150-155, 2016.

FURLAN, E. F. Valoração da qualidade do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) desembarcado no litoral de São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 3, p. 317-326, 2011.

GOMEZ-CARAVACA, A. M.; GOMEZ-ROMERO, M.; ARRAEZ-ROMAN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1220–1234, 2006.

GONÇALVES, A. A.; OLIVEIRA, A. R. M. DE; ABRANTES, M. R. Acerola Fruit as a Possible Antimelanotic Agent in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Food Processing**, p. 1–9, 2015.

GOSWAMI, T. K.; RAVINDRA, M. R.; NAYAK, T. K. Time-temperature relationships for IQF shrimp with liquid nitrogen and its quality assessment. **Journal of Food Process Engineering**, v. 24(2), p. 71–85, 2001.

HAMM, R. Biochemistry of meat hydration. Advances in **Food Research**, v.10, p. 335-443, 1960.

HUANG, J. Y.; CHEN, Q. C.; QIU, M.; LI, S. Q. Chitosan-based edible coatings for quality preservation of postharvest whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 77 (4), 2012.

LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MARTÍNEZ-ALVAREZ, O.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. DEL C.; MONTERO, P. Quality of thawed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) treated with melanosis-inhibiting formulations during chilled storage. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 42(9), p. 1029–1038, 2007.

MONTERO, P.; LOPEZ-CABALLERO, M. D.; PEREZ-MATEO, M. The effect of inhibitors and high pressure treatment melanosis and microbial growth on chilled prawns (*Penaeus japonicus*). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 66, n. 8, p. 1201-1206, 2001.

MORENO, G. M. B.; LOUREIRO, C. M. B.; SOUZA, H. B. A. Características qualitativas da carne ovina. **Revista Nacional da Carne**, v. 381, p. 76-90, 2008.

OSÓRIO, J. C. S.; OSÓRIO, M. T. M.; JARDIM, P. O. C.; PIMENTEL, M. A.; POUEY, J. L. O.; LÜDER, W. E. Métodos para avaliação de carne ovina “in vivo”, na carcaça e na carne. Pelotas: Ed. Universitária/UFPEL, 1998.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. Ciência, higiene e tecnologia da carne. Goiânia: UFG, 2. ed, p. 623, 2001.

QUEIROGA, I. M. B. N.; SILVA, J. A. S.; CAVALHEIRO, J. M. O.; QUEIROGA, R. C. R. E.; BATISTA, A. S. M.; BARRETO, T. A. Qualidade sensorial do camarão *Litopenaeus vannamei* congelado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 1801-1812, 2014.

ROCHA, I. P., RODRIGUES, J., AMORIM, L. A Carcinicultura Brasileira em 2003. **Revista da Associação Brasileira dos Criadores de Camarão – ABCC**, v. 6, p. 30–36, 2004.

SENAPATI S. R.; KUMAR G. P.; SINGH C. B.; XAVIER K. M.; CHOUKSEY M. K.; NAYAK, B. B. Melanosis and quality attributes of chill stored farm raised whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Applied and Natural Science**, v. 9, p. 626–631, 2017.

SUN, L.; SUN, J.; CHEN, L.; NIU, P.; YANG, X.; GUO, Y. Preparation and characterization of chitosan film incorporated with thinned young apple polyphenols as an active packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v. 163, p. 81–91, 2017.

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

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

WU, D; SUN, D. W. Application of visible and near infrared hyperspectral imaging for noninvasively measuring distribution of water-holding capacity in salmon flesh. **Talanta**, v. 116, p. 266-276, 2013.

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

CAPÍTULO IV
REVESTIMENTO DE QUITOSANA COMBINADO COM EXTRATO DE PRÓPOLIS
VERDE E VERMELHA NA QUALIDADE DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*
CONGELADO

REVESTIMENTO DE QUITOSANA COMBINADO COM EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA NA QUALIDADE DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* CONGELADO

RESUMO

O camarão branco (*Litopenaeus vannamei*) destaca-se pelo sabor, textura e aroma característico e pelo seu alto valor mercado mas é também uma proteína com alto grau perecibilidade em virtude disso, as coberturas comestíveis elaboradas a partir de conservantes naturais estão sendo amplamente investigadas para que combinadas com as técnicas tradicionais de conservação possam prolongar a vida útil do camarão e oferecer maior segurança alimentar aos consumidores. A partir do exposto, objetivou-se avaliar o efeito do revestimento comestível de quitosana combinado com extrato de própolis verde (QEPVD) e extrato de própolis vermelha (QEPVM) como conservante natural na vida de prateleira do camarão branco durante 180 dias de armazenamento congelado à $\pm - 18^{\circ}\text{C}$. Para isto, foram realizadas análises físico-químicas: pH e TBARS, umidade, perda de peso por cocção - PPC, capacidade de retenção de água - CRA e textura e análises microbiológicas a cada 30 dias durante 180 dias. Os resultados indicaram que os revestimentos QEPVD e QEPVM inibiram significativamente o aumento na contagem total de mesófilas, promoveu manutenção do pH enquanto que nos grupos Controle e Glaciado os valores foram mais elevados durante todo o experimento. Os valores de TBARS se mantiveram baixos durante os 180 dias de armazenamento e, portanto, houve estabilidade oxidativa nas amostras tratadas. Além disso, em comparação com o grupo controle, foi observada melhor capacidade de retenção de água nos grupos QEPVD e QEPVM, e redução significativa ($P < 0,05$) na perda de peso por cocção foi observada nos camarões do grupo QEPVD. Os resultados sugeriram que a incorporação do extrato de própolis verde e vermelha à quitosana aumentou a eficácia dos revestimentos e esta combinação pode ser promissora para uso como conservante natural com o objetivo de estender a vida útil de alimentos.

Palavras-chave: pescado, qualidade do pescado, antioxidante natural, antimicrobiano natural.

CHITOSAN COATING COMBINED WITH GREEN PROPOLIS EXTRACT IN THE QUALITY OF SHRIMP *Litopenaeus vannamei* FROZEN

ABSTRACT

The white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) stands out for its characteristic flavor, texture and aroma and for its high market value but it is also a protein with a high degree of perishability because of that, edible toppings made from natural preservatives are being extensively investigated for that combined with traditional conservation techniques can extend the shelf life of the shrimp and offer greater food security to consumers. Based on the above, the objective was to evaluate the effect of the edible chitosan coating combined with green propolis extract (QEPVD) and red propolis extract (QEPVM) as a natural preservative in the shelf life of white shrimp during 180 days of frozen storage. $\pm - 18^{\circ}\text{C}$. For this, physical-chemical analyzes were carried out: pH and TBARS, humidity, weight loss by cooking - PPC, water retention capacity - CRA and texture and microbiological analyzes every 30 days for 180 days. The results indicated that the QEPVD and QEPVM coatings significantly inhibited the increase in the total mesophilic count, promoted maintenance of pH while in the Control and Glacier groups the values were higher throughout the experiment. The TBARS values remained low during the 180 days of storage and, therefore, there was oxidative stability in the treated samples. In addition, compared to the control group, better water retention capacity was observed in the QEPVD and QEPVM groups, and a significant reduction ($P < 0.05$) in cooking weight loss was observed in the QEPVD group shrimp. The results suggested that the incorporation of green and red propolis extract to chitosan increased the effectiveness of the coatings and this combination can be promising for use as a natural preservative with the aim of extending the shelf life of foods.

Keywords: fish, fish quality, natural antioxidant, natural antimicrobial.

1 INTRODUÇÃO

O alto valor de mercado e as características nutricionais e sensoriais apreciadas, faz do camarão é um recurso alimentar importante em todo o mundo. O camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) é nativo da costa do Pacífico do México e é a espécie de camarão mais comumente cultivada no mundo e a principal espécie de crustáceo cultivada no Brasil (FAO, 2020).

No entanto, a vida útil do camarão é limitada devido às características intrínsecas (alta atividade de água, pH próximo da neutralidade e composição química) que favorecem a deterioração microbiológica e enzimática durante o armazenamento (ZHANG *et al.*, 2015). Para evitar a perda de qualidade e a rápida deterioração, logo após a despesca o camarão é submetido ao resfriamento com uso de gelo, e em alguns casos, a aplicação de aditivos químicos para conservação.

As técnicas mais comuns utilizadas para conservar o camarão são resfriamento, congelamento e cocção esta última pode ser combinada com o congelamento (WU, 2014).

Erdogdu *et al.* (2004) apresentam alguns problemas de qualidade associados ao processamento do camarão congelado, os autores citam a perda de peso devido ao cozimento, descoloração, oxidação de lipídica, desnaturação de proteínas, aumento de n-BVT, mudanças de textura, diminuição da capacidade de retenção de água e perda de umidade por gotejamento. Hui *et al.* (2004) citam ainda o ressecamento como causador de perda de umidade e queima do camarão durante o armazenamento congelado, nesse caso, além de causar danos a textura do camarão ainda gera perdas no rendimento.

Para otimizar as técnicas de conservação já utilizadas pela indústria, pesquisadores de diversas áreas tem como desafio desenvolver conservantes de bases naturais, revestimentos comestíveis e embalagens ativas usando tecnologia barata e de fácil implementação sem afetar as características nutricionais, sensoriais e a segurança dos alimentos (HAVELAAR *et al.*, 2010).

Atualmente vários estudos estão sendo desenvolvidos com polímeros naturais (polissacarídeos, proteínas) sendo a quitosana uma das bases poliméricas mais utilizadas por ser biodegradável, possuir boa formação de filme e biocompatibilidade além de apresentar capacidade antioxidante e antimicrobiana (BERIZI *et al.*, 2018).

A própolis é uma substância natural, produzida pelas abelhas e contém uma variedade de compostos químicos, como polifenóis (flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres), terpenóides, esteróides e aminoácidos, aldeídos voláteis e cetonas (CHAILLOU; NAZARENO,

2009). Os compostos presentes no extrato de própolis apresentam ampla atividade antioxidante e antibacteriana (Silva et al., 2006) características que favorecem o uso do extrato de própolis como potencial conservante natural.

Perdones *et al.* (2016), destacam que uso de revestimentos comestíveis promove melhorias na qualidade dos produtos, inibe o desenvolvimento de microrganismos, controla a atividade de água além de atuar como barreira ao oxigênio evitando que os alimentos se deterioreem mais rapidamente.

Nesse sentido, objetivou-se com o presente estudo, avaliar a eficiência do revestimento de quitosana combinado com extratos das própolis verde e vermelha como conservante natural na qualidade do camarão branco *L. vannamei* congelado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Soluções de revestimento

O revestimento de quitosana (Q) foi preparado contendo 1,5% de quitosana e 0,3% de glicerol, dissolvidos em ácido acético a 1% (p / v). A solução foi mantida sob agitação durante 24 h à temperatura ambiente. Para o revestimento de Q 1,5% combinado com EPVD 0,25% (QEPVD) e Q 1,5% combinado com EPVM 0,25% (QEPVM) foi incorporado extrato de própolis à quitosana e manteve-se sob agitação durante 1 h à temperatura ambiente.

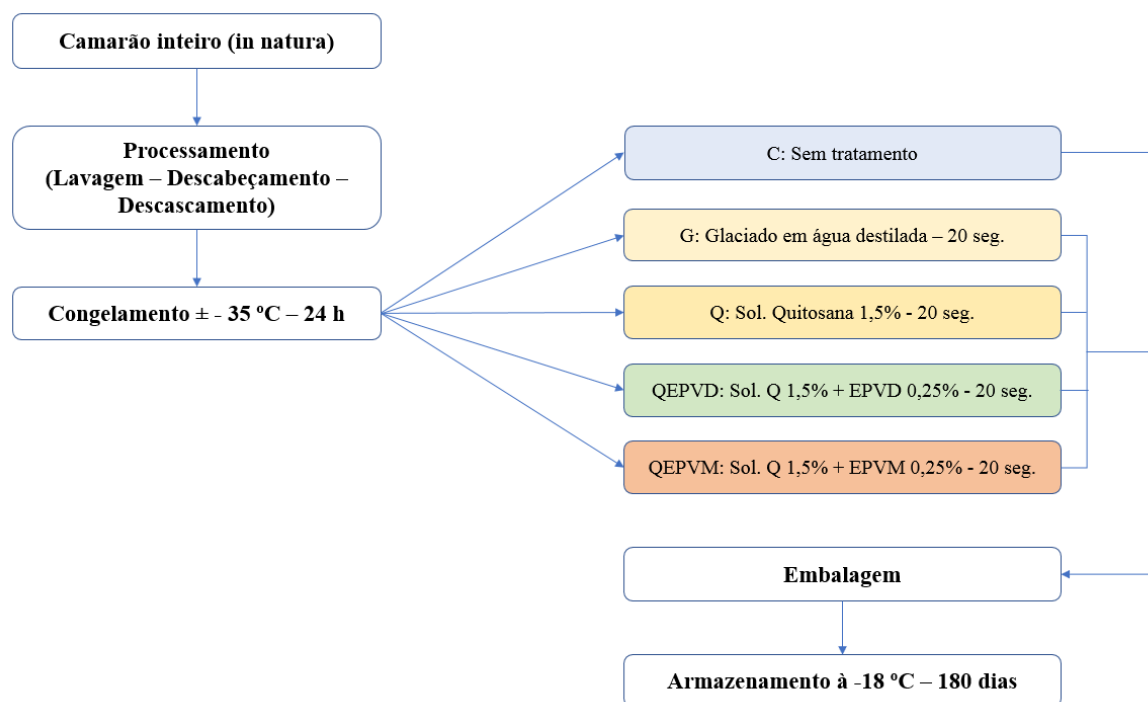
2.2 Coleta e tratamento dos camarões

Foram adquiridos aproximadamente 23 kg de camarão (*Litopenaeus vannamei*) em uma fazenda no Município de Mossoró, Rio Grande do Norte. Logo após a despesca o camarão foi acondicionado em caixa isotérmica contendo gelo na proporção 1:1 e transportados imediatamente para o Laboratório de Tecnologia e Controle de Qualidade do Pescado-LAPESC da Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

Os camarões foram lavados, descabeçados e descascados e em seguida foram dispostos em bandejas plásticas para congelamento em ultra freezer à $\pm - 35$ °C. Após 24 h o camarão foi separado em 5 grupos: Grupo C - sem tratamento; Grupo G - camarão glaciado; Grupo Q – camarão revestido com quitosana 1,5%; Grupo QEPVD – camarão revestido com quitosana 1,5% + extrato de própolis verde 0,25% e Grupo QEPVM - camarão revestido com quitosana

1,5% + extrato de própolis vermelha 0,25% todo o processo foi realizado em condições assépticas e seguiu o fluxograma de delineamento experimental representado na Figura 1.

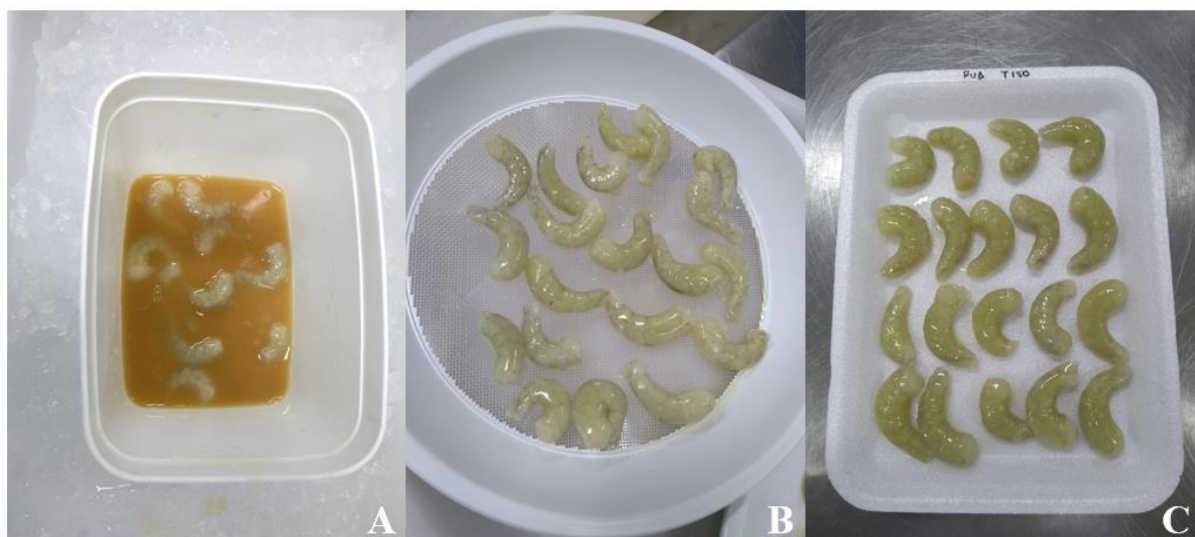
Figura 1. Fluxograma do planejamento experimental.



C: grupo controle; G: grupo glaciado; Q: grupo revestido com quitosana 1,5%; QEPVD: grupo revestido com quitosana 1,5% + extrato de própolis verde 0,25% e QEPVM: grupo revestido com quitosana 1,5% + extrato de própolis vermelha 0,25%.

Os revestimentos foram aplicados no camarão por imersão (Figura 2-A), as porções de camarão congelado foram imersas por 20 segundos na solução de revestimento e drenadas por 1 minuto em peneira plástica (Figura 2-B). O glaciamento foi semelhante à aplicação dos revestimentos, os camarões foram imersos em água destilada a $2\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 20 segundos e submetidos à drenagem em peneira plástica.

Figura 2. Processo de aplicação do revestimento.



Fonte: própria do autor (2020). A – Aplicação do revestimento por imersão; B – Drenagem; C – embalagem.

Os camarões foram acondicionados em bandejas de isopor com aproximadamente 120g de amostra por bandeja (Figura 2-C), totalizando 70 bandejas, as bandejas foram devidamente identificadas, envolvidas em filme de PVC e armazenadas a $\pm -18^{\circ}\text{C}$ por 180 dias.

2.4 Análises físico-químicas

2.4.1 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH das amostras foi determinado a cada 30 dias durante os 180 dias de armazenamento de acordo com a metodologia estabelecida pelo AOAC (2011) com auxílio de um medidor de pH da marca Tecnal modelo R-TEC-7 devidamente calibrado.

2.4.2 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Para o teste de TBARS, foi utilizado 0,5g de camarão previamente macerado, com adição da solução estoque (ácido tiobarbitúrico a 0,375%, ácido tricloroacético a 15% e HCL a 0,25M) e quando positivas as amostras desenvolvem a cor rosa durante o aquecimento. A absorbância da solução foi determinada em 532nm contra o branco. A quantidade de TBARS

foi expressa em miligramas de malonaldeído por kg de camarão (AMSA, 2012). A análise de TBARS foi realizada a cada 30 dias durante os 180 dias de armazenamento.

2.4.3 Umidade

A umidade (UM) foi realizada em triplicata no tempo inicial e final do experimento, determinada por gravimetria, as amostras foram submetidas a secagem em estufa a 105 °C por 24h. A umidade foi calculada pela diferença entre a massa inicial e final. O valor foi expresso em porcentagem (AOAC, 2011).

2.4.4 Capacidade de Retenção de Água (CRA)

A CRA foi determinada de acordo com metodologia descrita por Hamm (1960) que se baseia na medição da perda de água liberada pela amostra quando submetida uma pressão sobre o tecido muscular. A quantidade de água livre da amostra foi obtida pela diferença entre o peso inicial e final expressa em porcentagem de peso perdido da amostra inicial.

2.4.5 Perda de Peso por Cocção (PPC)

Para determinação da PPC as amostras foram pesadas e submetidas a cocção em *grill*, onde a temperatura interna do músculo ficou em torno de 75°C, após isto, as amostras foram retiradas do *grill* e pesadas novamente. O resultado foi dado em porcentagem de perda de água durante o processo térmico (OSÓRIO *et al.*, 1998).

2.4.6 Força de Cisalhamento (FC)

A força de cisalhamento foi mensurada por meio de um TEXTURE ANALYZER TA-XT-125, acoplado ao dispositivo Warner-Bratzler, o qual expressa a força em kgf/cm² (HAMM, 1960).

2.4.7 Cor

A cor foi avaliada através do colorímetro Konica Minolta, CM-700d/600d (Sistema CIE L*a*b*), cujo sistema considera as coordenadas L* (luminosidade) representa a luminosidade

em uma escala de 0 (preto) a 100 (branco), a^* (teor de vermelho) varia de valores negativos para tons de verde a positivos para vermelho e b^* (teor de amarelo) varia de valores negativos para azul e valores positivos para amarelo (ZHANG *et al.*, 2015).

As análises acima citadas foram realizadas em triplicata a cada 30 dias durante os 180 dias de armazenamento.

2.5 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas nos dias 0, 30, 60, 90, 150 e 180 de armazenamento a -18 ± 1 °C. Foram previamente pesadas 25g da amostra de forma asséptica e transferidas para sacos plásticos estéreis, acrescidos com 225 mL de água peptonada tamponada estéril e posteriormente homogeneizados em “Stomacher” por 2 minutos, obtendo assim a diluição 10^{-1} , a partir da qual foram obtidas as demais diluições até 10^{-4} . Concluídas as diluições, as amostras foram submetidas às técnicas para determinação da presença de *Salmonella* spp. no tempo inicial do experimento, contagem de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (BRASIL, 2017) nos tempos inicial e final. Também foram realizadas a contagem total de psicrotróficas e de bactérias aeróbias mesófilas a cada trinta dias durante 180 dias de experimento, utilizando a metodologia recomenda pela American Public Health Association (DOWNES; ITO 2001).

2.6 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. As médias foram agrupadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados foram analisados utilizando o software estatístico R.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores de pH (Tabela 1) ao longo dos dias de armazenamento e entre os tratamentos. O pH aumentou em função do tempo, no entanto, os camarões tratados com a quitosana (Q) e a combinação de quitosana e extrato de própolis verde QEPVD e extrato de própolis vermelha QEPVM apresentaram valores médios de pH mais baixos enquanto que nos grupos C e G os valores encontrados foram mais altos em todo o período do experimento.

A legislação brasileira determina que o pH ideal para camarão resfriado deve ser inferior a 7,85 (BRASIL, 2019b), Goswami *et al.* (2001) relatam que valores de pH em torno de 7,2 indica boa qualidade e Chouljenko *et al.* (2017) destacam que estando o pH acima de 7,95 o camarão é considerado impróprio para consumo. Os valores de pH encontrados no presente estudo estiveram abaixo do valor limite determinado pela legislação brasileira.

Vale ressaltar que o pH é uma variável chave para qualidade e vida útil dos alimentos e, portanto, a manutenção do pH é um fator importante uma vez que o aumento do valor deste pode estar relacionado a perda de qualidade e redução da vida útil do alimento.

Tabela 1. Valores médios de pH e TBARS das amostras de camarão (*L. vannamei*) congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.

Variável	Dias	Tratamentos									
		C		G		Q		QEPVD		QEPVM	
pH	0	5,99±0,04	bC	6,32±0,08	aB	5,73±0,14	cE	5,87±0,17	bcB	5,33±0,29	dC
	30	6,39±0,06	aB	6,31±0,1	aB	5,58±0,15	bcDE	5,73±0,03	bB	5,33±0,09	cC
	60	6,80±0,14	aA	6,78±0,13	aA	6,31±0,01	cAB	6,57±0,09	abA	6,38±0,06	bcA
	90	6,68±0,10	aAB	6,64±0,12	aA	6,47±0,08	abA	6,60±0,12	abA	6,37±0,09	bA
	120	6,55±0,12	aAB	6,72±0,13	aA	5,91±0,15	bCD	5,95±0,09	bB	6,11±0,2	bAB
	150	6,81±0,06	aA	6,75±0,04	aA	6,16±0,10	bBC	5,77±0,09	cB	5,87±0,14	cB
	180	6,65±0,05	aAB	6,54±0,06	aAB	6,11±0,03	bBC	5,87±0,06	bB	5,89±0,03	bB
TBARS	0	0,06±0,02	aD	0,07±0,03	aC	0,05±0,01	aD	0,06±0,03	aB	0,05±0,02	aB
	30	0,13±0,05	aBC	0,07±0,01	bC	0,06±0,01	bCD	0,07±0,04	bAB	0,09±0,03	abAB
	60	0,22±0,00	aA	0,14±0,06	bAB	0,15±0,01	bA	0,10±0,01	bAB	0,09±0,02	bAB
	90	0,10±0,00	adC	0,09±0,00	aBC	0,09±0,02	aBCD	0,08±0,00	aAB	0,08±0,00	aAB
	120	0,19±0,07	aA	0,18±0,01	aA	0,12±0,04	bABC	0,07±0,01	bAB	0,08±0,02	bAB
	150	0,06±0,01	aD	0,06±0,00	aC	0,06±0,01	aCD	0,04±0,01	aB	0,04±0,01	aB
	180	0,16±0,01	aAB	0,15±0,00	aAB	0,13±0,01	aAB	0,13±0,00	aA	0,13±0,01	aA

Dados relatados como média ± desvio padrão. Mesma letra, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). C: grupo controle; G: grupo glaciado; Q: grupo quitosana; QEPVD: grupo extrato de própolis verde e QEPVM: grupo de quitosana combinada com extrato de própolis vermelha.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores de TBARS (Tabela 1) entre os tratamentos e em função do tempo de armazenamento. A legislação brasileira não determina valores mínimos e máximos para TBARS embora esta variável seja um importante indicador de qualidade já que a oxidação lipídica causa rancidez e afeta diretamente a qualidade do pescado, Chouljenko *et al.* (2017) ressaltam que durante o armazenamento a oxidação lipídica pode causar degradação da textura, sabor e odor em pescado.

Aos 180 dias de armazenamento não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos e no decorrer de todo o experimento o TBARS de cada tratamento não ultrapassou o limite máximo que indica boa qualidade (5 mg MDA / kg de amostra) descrito por Ibrahim Salam (2007). Cadun *et al.* (2008) relatam que para consumo, o limite de oxidação lipídica é

de 7 – 8 mg de malonaldeído/kg no alimento. Portanto, os valores de TBARS encontrados nesse estudo indicam estabilidade oxidativa nas amostras durante os 180 dias de armazenamento.

Com relação a umidade (Tabela 2), foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) em função do tempo de armazenamento somente no grupo Q, maior perda de umidade também foi observada neste grupo, com 80,41% de UM no tempo inicial e 77,3% UM no tempo final, esse comportamento pode estar relacionado a desidratação superficial que de acordo com Shenouda, (1980) resulta na diminuição da capacidade de retenção de água nos tecidos.

Chouljenko *et al.* (2017) argumentam que a manutenção do peso em camarões revestidos/glaciados pode ser atribuída ao equilíbrio da desnaturação proteica e sublimação de água como resultado da interação dos compostos presentes nos revestimentos e as proteínas de superfície do camarão.

É possível observar que os tratamentos QEPVD e QEPVM mantiveram o peso ao longo dos 180 dias de experimento diferente do que aconteceu quando o revestimento foi composto só por quitosana, dessa forma, entende-se que a incorporação dos extratos à quitosana foi importante para manutenção do peso do camarão.

Tabela 2. Valores médios de umidade das amostras de camarão (*L. vannamei*) congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.

Variável	Dias	Tratamentos				
		C	G	Q	QEPVD	QEPVM
UM (%)	0	78,9±0,4 bA	79,4±0,1 abA	80,4±1,8 abA	80,0±0,8 abA	80,9±1,1 aA
	180	77,8±0,2 bA	78,8±0,0 abA	77,3±0,3 bB	79,0±0,3 abA	80,2±0,6 aA

Dados relatados como média $\pm$ desvio padrão. Mesma letra, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem estaticamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). C: grupo controle; G: grupo glaciado; Q: grupo quitosana; QEPVD: grupo extrato de própolis verde e QEPVM: grupo de quitosana combinada com extrato de própolis vermelha.

Na Tabela 3 é possível observar que o grupo Q apresentou redução na CRA ao longo do período de armazenamento corroborando com os resultados de umidade (Tabela 2) neste mesmo grupo, que ao final dos 180 dias de armazenamento apresentou maior perda de umidade ocasionando redução na capacidade de reter água nos tecidos (SHENOUDA, 1980).

Tabela 3. Valores médios de capacidade de retenção de água - CRA das amostras de camarão (*L. vannamei*) congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.

Variável	Dias	Tratamentos									
		C		G		Q		QEPVD		QEPVM	
CRA (%)	0	63,1±1,9	aA	53,5±1,3	abB	60,6±6,1	abABC	50,6±4,8	bBC	51,9±3,8	abAB
	30	60,8±0,2	aA	61,4±0,6	aAB	50,9±1,7	aC	53,8±3,5	aBC	50,0±4,5	aB
	60	67,0±2,0	aA	56,7±3,1	abAB	52,7±3,7	bBC	60,0±2,0	abBC	60,5±2,5	abAB
	90	65,9±6,4	aA	59,4±0,9	aAB	56,5±3,5	aABC	61,8±3,3	aA	62,1±1,1	aAB
	120	67,1±14,5	aA	69,7±10,4	aA	66,3±7,7	aA	53,9±3,3	bBC	60,1±8,6	bAB
	150	68,4±6,7	aA	62,8±1,8	aAB	65,1±11,9	aAB	59,2±2,1	aBC	64,0±3,0	aA
	180	62,2±5,4	aA	53,5±3,0	abB	57,1±5,9	abABC	47,2±0,8	bB	57,3±5,0	abAB

Dados relatados como média $\pm$ desvio padrão. Mesma letra, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem estaticamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). C: grupo controle; G: grupo glaciado; Q: grupo quitosana; QEPVD: grupo extrato de própolis verde e QEPVM: grupo de quitosana combinada com extrato de própolis vermelha.

Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) em função do tempo no grupo controle já nos demais grupos houve variação significativa. De maneira geral, a incorporação do extrato de própolis à quitosana aumentou a capacidade de retenção de água dos grupos QEPVD e QEPVM embora aos 180 dias tenha havido uma redução. Queiroga *et al.* (2014) relatam que alimentos com boa capacidade de retenção de água apresenta menor perda de peso durante o armazenamento.

A CRA no grupo QEPVM foi estatisticamente mais alta que no G, vale ressaltar que o glaciamento é a técnica mais utilizada em pescado congelado para evitar perda de umidade e oxidação lipídica (VANHAECKE *et al.*, 2010).

Houve variação ($p < 0,05$) na perda de peso por cocção em função do tempo em todos os tratamentos (Tabela 4) e diferença entre os tratamentos.

Aos 180 dias de armazenamento a PPC foi menor em todos os tratamentos incluindo o grupo C e somente no grupo Q a PCC foi semelhante nos tempos 0, 150 e 180. O grupo QEPVD apresentou melhores resultados ao longo do experimento quando comparado ao G por exemplo, demonstrando que a combinação do extrato de própolis vermelha com a quitosana diminuiu a perda de peso pós cocção. A PPC é também uma das variáveis que estão associadas ao rendimento final da carne (De SOUZA SILVA, 2019), dessa forma, mecanismos que auxiliem na CRA e evitem perdas após a cocção são extremamente necessários.

Tabela 4. Valores médios de perda de peso por cocção - PPC das amostras de camarão (*L. vannamei*) congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.

Variável	Dias	Tratamentos									
		C		G		Q		QEPVD		QEPVM	
PPC (%)	0	55,0±0,4	aA	51,8±0,9	abA	46,9±2,7	cAB	49,2±0,5	bcAB	46,3±1,7	cA
	30	50,2±0,6	aB	49,9±0,5	aAB	43,9±0,4	bB	43,7±2,3	bCD	44,5±1,4	bAB
	60	50,2±0,6	aB	49,9±0,5	aAB	43,9±0,4	bB	43,7±2,3	bCD	44,5±1,4	bAB
	90	49,1±0,2	aB	48,1±0,9	abAB	50,0±2,4	aA	49,6±1,8	aA	45,1±4,6	bAB
	120	51,8±0,9	aAB	50,7±0,5	aAB	38,1±1,3	cC	39,1±0,8	cE	44,4±0,8	bAB
	150	50,0±1,8	abB	51,4±1,5	abA	46,4±3,0	bcAB	45,6±1,6	cdBC	42,4±1,3	dB
	180	51,3±1,1	aAB	46,9±2,3	bB	46,4±2,0	bAB	40,3±1,3	cDE	41,4±0,8	cB

Dados relatados como média ± desvio padrão. Mesma letra, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). C: grupo controle; G: grupo glaciado; Q: grupo quitosana; QEPVD: grupo extrato de própolis verde e QEPVM: grupo de quitosana combinada com extrato de própolis vermelha.

Houve variação na força de cisalhamento em função do tempo em todos os grupos (Tabela 5) no entanto, nos tempos 30 e 90 não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

Aos 180 dias de experimento a força de cisalhamento aumentou em função do tempo em todos os tratamentos exceto grupo G, não havendo diferença significativa entre os grupos Q, QEPVD e QEPVM dessa forma entende-se que a incorporação do extrato de própolis à quitosana não causou nenhum tipo alteração na textura dos camarões tratados.

O método de congelamento utilizado nesse estudo foi o lento, Queiroga *et al.* (2014) em seu estudo sobre diferentes métodos de congelamento observou que houve aumento da FC em função do tempo especialmente nas amostras submetidas ao congelamento lento.

De maneira geral, os resultados obtidos nesse estudo corroboram com Hale e Waters (1981) quando relatam que a carne descongelada tende a apresentar valores maiores de FC do que a carne *in natura*.

Tabela 5. Valores médios de força de cisalhamento - FC das amostras de camarão (*L. vannamei*) congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.

Variável	Dias	Tratamentos									
		C		G		Q		QEPVD		QEPVM	
FC (kgf)	0	1,0±0,1	bD	1,3±0,0	abBC	1,2±0,1	abBC	1,2±0,1	abD	1,4±0,0	aBC
	30	1,2±0,0	aCD	1,2±0,2	aBC	1,4±0,0	aAB	1,4±0,0	aBCD	1,3±0,1	aC
	60	1,1±0,0	cD	1,4±0,1	abAB	1,0±0,0	cC	1,2±0,2	bcCD	1,7±0,1	aAB
	90	1,3±0,0	aBCD	1,4±0,0	aABC	1,3±0,0	aAB	1,5±0,0	aABCD	1,6±0,0	aABC
	120	1,4±0,1	bABC	1,6±0,0	abA	1,4±0,1	bAB	1,5±0,1	abABC	1,7±0,1	aA
	150	1,7±0,0	aA	1,6±0,0	abA	1,4±0,1	bAB	1,6±0,0	abAB	1,6±0,1	abAB
	180	1,5±0,1	aAB	1,1±0,0	bC	1,5±0,2	aA	1,8±0,0	aA	1,7±0,1	aAB

Dados relatados como média $\pm$ desvio padrão. Mesma letra, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem estaticamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). C: grupo controle; G: grupo glaciado; Q: grupo quitosana; QEPVD: grupo extrato de própolis verde e QEPVM: grupo de quitosana combinada com extrato de própolis vermelha.

A cor é um atributo sensorial decisivo para o consumidor, nesse sentido, é importante que o revestimento a ser aplicado não altere a cor característica alimento.

A luminosidade ou L^* está relacionada ao frescor do pescado, no presente estudo não foi observado diferença significativa ($p > 0,05$) no valor L^* entre os tratamentos nos tempos 0, 30, 90, 150 e 180 (Tabela 6). Houve diminuição da luminosidade ao longo do tempo de armazenamento nos grupos C, Q, QEPVD e QEPVM que pode estar relacionada a perda de frescor.

Houve diferença significativa nos valores de a^* nos tratamentos em função do tempo de armazenamento, exceto no grupo G. O a^* varia de valores negativos para tons de verde a positivos para vermelha (ZHANG *et al.*, 2015), não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o grupo QEPVD e os grupos C e G nos tempos 0, 30, 90, 150, portanto, pode se sugerir que não houve alteração de cor relacionada a este revestimento. O grupo QEPVM apresentou maiores valores de a^* quando comparado aos grupos C e G do tempo 30 até os 180 dias e neste caso os resultados podem estar relacionados a cor característica do extrato de própolis vermelha.

Maiores valores de b^* foram observados no grupo QEPVM ao longo de todo o período de armazenamento, Zhang *et al.* (2015) dizem que o b^* varia de valores negativos para azul e valores positivos para amarelo, logo, os resultados encontrados podem estar associados a coloração do revestimento. Vale ressaltar que aos 180 dias de armazenamento não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 6. Valores médios de L^* a^* b^* das amostras de camarão (*L. vannamei*) congelado submetidas a diferentes tratamentos durante 180 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.

Variável	Dias	Tratamentos									
		C		G		Q		QEPVD		QEPVM	
L^*	0	71,2 $\pm$ 1,8	aAB	71,3 $\pm$ 0,6	aA	72,2 $\pm$ 1,8	aA	72,8 $\pm$ 1,2	aAB	72,9 $\pm$ 1,9	aA
	30	72,5 $\pm$ 2,4	aA	71,6 $\pm$ 1,0	aA	72,4 $\pm$ 2,0	aA	73,9 $\pm$ 1,4	aA	72,8 $\pm$ 2,0	aA
	60	72,2 $\pm$ 1,1	abAB	69,6 $\pm$ 3,6	bA	73,9 $\pm$ 1,4	aA	68,6 $\pm$ 2,4	bB	72,2 $\pm$ 1,5	abAB
	90	69,9 $\pm$ 2,4	aAB	69,3 $\pm$ 0,5	aA	71,4 $\pm$ 1,8	aAB	70,8 $\pm$ 0,9	aAB	70,7 $\pm$ 0,8	aABC
	120	73,6 $\pm$ 2,6	aA	68,8 $\pm$ 2,9	bcA	72,5 $\pm$ 2,3	abA	73,9 $\pm$ 1,2	aA	67,7 $\pm$ 0,9	bBC
	150	73,6 $\pm$ 0,7	aA	70,2 $\pm$ 0,2	aA	73,0 $\pm$ 2,6	aA	69,6 $\pm$ 0,8	aAB	69,6 $\pm$ 3,0	aABC
	180	67,6 $\pm$ 1,4	aB	67,9 $\pm$ 0,7	aA	67,4 $\pm$ 2,2	aB	63,8 $\pm$ 1,1	aC	67,4 $\pm$ 2,2	aC
a^*	0	0,08 $\pm$ 0,2	aBC	0,06 $\pm$ 0,2	aA	-0,13 $\pm$ 0,3	aB	-0,14 $\pm$ 0,2	aCD	0,35 $\pm$ 0,3	aC
	30	0,05 $\pm$ 0,1	bC	0,18 $\pm$ 0,3	abA	0,16 $\pm$ 0,2	abAB	-0,10 $\pm$ 0,2	bCD	0,61 $\pm$ 0,3	aBC
	60	0,70 $\pm$ 0,2	bAB	0,71 $\pm$ 0,1	bA	0,50 $\pm$ 0,1	bAB	0,61 $\pm$ 0,4	bAB	1,57 $\pm$ 0,0	aA
	90	0,40 $\pm$ 0,2	bABC	0,46 $\pm$ 0,2	bA	0,2 $\pm$ 0,0	abB	0,25 $\pm$ 0,1	bBCD	1,36 $\pm$ 0,3	aA
	120	-0,14 $\pm$ 0,1	cdC	0,45 $\pm$ 0,3	bcA	0,54 $\pm$ 0,2	bA	-0,37 $\pm$ 0,2	dD	1,70 $\pm$ 0,2	aA
	150	0,36 $\pm$ 0,1	bABC	0,68 $\pm$ 0,0	bA	0,63 $\pm$ 0,0	bA	0,3 $\pm$ 0,0	bBC	1,50 $\pm$ 0,2	aA
	180	0,74 $\pm$ 0,3	abA	0,45 $\pm$ 0,3	bA	0,61 $\pm$ 0,4	bA	1,0 $\pm$ 0,3	abA	1,10 $\pm$ 0,1	aAB
b^*	0	5,1 $\pm$ 1,0	abAB	4,5 $\pm$ 0,3	aA	3,9 $\pm$ 0,5	bB	6,7 $\pm$ 0,8	aAB	6,0 $\pm$ 0,7	abB

30	5,2±0,7	aAB	5,7±1,4	aA	5,3±0,3	aAB	7,4±2,2	aAB	6,6±1,1	aB
60	6,8±0,1	bcAB	6,4±0,7	bcA	4,8±3,9	cAB	7,7±1,0	abAB	10,2±0,1	aA
90	5,1±1,3	bAB	4,9±0,4	bA	4,8±0,9	bAB	5,4±0,6	bB	9,7±0,5	aA
120	4,0±0,3	bB	5,6±1,1	bA	6,0±0,7	bAB	6,6±1,1	bAB	9,6±1,0	aA
150	7,8±0,6	aA	7,1±0,2	aA	7,1±1,4	aA	9,0±1,6	aA	8,7±0,2	aAB
180	6,7±0,5	aAB	6,2±1,2	aA	6,2±1,0	aAB	8,6±0,6	aA	8,5±0,4	aAB

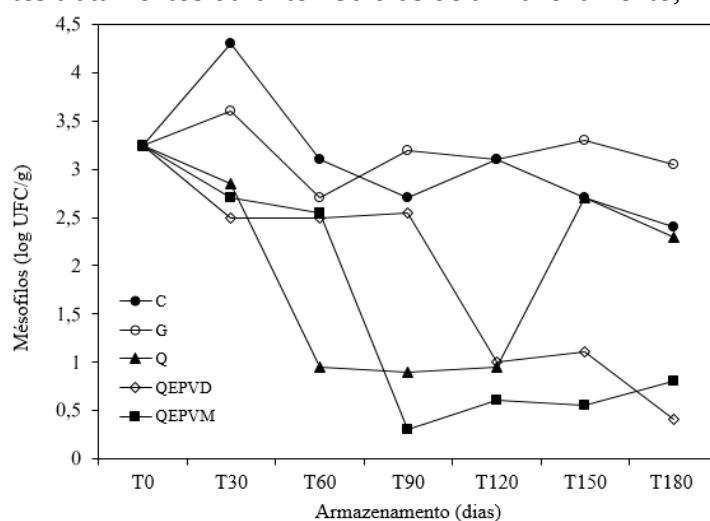
Dados relatados como média $\pm$ desvio padrão. Mesma letra, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). C: grupo controle; G: grupo glaciado; Q: grupo quitosana; QEPVD: grupo extrato de própolis verde e QEPVM: grupo de quitosana combinada com extrato de própolis vermelha.

Os resultados obtidos na contagem total de placas de aeróbicas mesófilas (Figura 3) mostram que houve inibição no crescimento de microrganismos em todos os grupos com queda acentuada na contagem dos grupos QEPVD e QEPVM a partir do dia 30 de armazenamento e ao final dos 180 dias de armazenamento o grupo G apresentou maior contagem de microrganismos.

Os resultados mostram que houve ação bacteriostática nos grupos tratados com quitosana e extrato de própolis. Duman e Ozpolat (2015), observaram em seus estudos que a aplicação de extrato de própolis em filés de peixe resfriados reduziu a contaminação microbiana ao longo do tempo de armazenamento.

Portanto, é possível afirmar que a incorporação do extrato de própolis à quitosana proporcionou a inibição do crescimento de microrganismos mesófilos no camarão congelado armazenado por 180 dias, dessa forma, é possível sugerir o uso do extrato de própolis verde e vermelho combinado com quitosana para estender a vida de prateleira do camarão congelado.

Figura 3. Contagem total de placas aeróbicas mesófilas de camarão (*L. vannamei*) congelado submetido a diferentes tratamentos durante 180 dias de armazenamento, Mossoró-RN, 2021.



C: grupo controle; G: grupo glaciado; Q: grupo quitosana; QEPVD: grupo quitosana + extrato de própolis verde e QEPVM: Grupo de quitosana + extrato de própolis vermelha.

4 CONCLUSÃO

A quitosana combinada com extrato de própolis verde e vermelha inibiu o desenvolvimento de microrganismos, promoveu o controle da oxidação lipídica e a manutenção do pH além de conferir melhores resultados na capacidade de retenção de água e manutenção do peso. Portanto, sugere-se que o revestimento de quitosana combinado com extrato de própolis verde e vermelha pode ser utilizado como uma alternativa natural eficaz aos conservantes sintéticos para melhorar a qualidade e estender a vida prateleira do camarão congelado.

REFERÊNCIAS

- AMSA. Meat color measurement guidelines. **American Meat Science Association**. USA, v. 2, p. 100-101, 2012.
- BERIZI, E.; HOSSEINZADEH, S.; SHEKARFOROUSH, S. S.; BARBIERI, G. Microbial, chemical, textural and sensory properties of coated rainbow trout by chitosan combined with pomegranate peel extract during frozen storage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 1004–1013, 2018.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Instrução Normativa nº 60 de 23 de dezembro de 2019. Estabelece a lista de padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União** nº 249, Brasília, DF, 26 dez, 2019 (a).
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 23 de 20 de agosto de 2019. Estabelece regulamento técnico e requisitos de qualidade para camarão, **Diário Oficial da União**, n. 166, Brasília, DF, 28 out, 2019 (b).
- CADUN, A.; KISLA, D.; CAKLI, S. Marination of deep-water pink shrimp with rosemary extract and the determination of its shelf-life. **Food Chemistry**, Barking, v. 109, n. 1, p. 81-87, 2008.
- CHAILLOU, L.; NAZARENO, M. A. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, p. 1422–1427, 2009.
- CHOULJENKO, A.; CHOTIKO, A.; BONILLA, F.; MONCADA, M.; REYES, V.; SATHIVEL, S. Effects of vacuum tumbling with chitosan nanoparticles on the quality characteristics of cryogenically frozen shrimp. **LWT – Food Science and Technology**, v. 75, p. 114–123, 2017.
- De SOUZA SILVA, D. A.; da SILVA CAMPELO, M. C.; de OLIVEIRA SOARES REBOUÇAS, L.; de OLIVEIRA VITORIANO, J.; ALVES, C.; ALVES da SILVA, J. B.; de

OLIVEIRA LIMA, P. Use of Cold Atmospheric Plasma To Preserve the Quality of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Food Protection**, v. 82, n. 7, p. 1217–1223, 2019.

DOWNES, F. P.; ITO, H. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. **American Public Health Association**, Washington, 4 ed. 676, 2001.

DUMAN, M.; ÖZPOLAT, E. Effects of water extract of propolis on fresh shibuta (*Barbus grypus*) fillets during chilled storage. **Food Chemistry**, v. 189, p. 80–85. 2015.

ERDOGDU, F.; BALABAN, M. O.; OTWELL, W. S.; GARRIDO, L. Cook-related yield loss for pacific white (*Penaeus vannamei*) shrimp previously treated with phosphates: effects of shrimp size and internal temperature distribution. **Journal of Food Engineering**, v. 64, n. 3, p. 297–300, 2004.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome, 2020.

GOSWAMI, T. K.; RAVINDRA, M. R.; NAYAK, T. K. Time-temperature relationships for IQF shrimp with liquid nitrogen and its quality assessment. **Journal of Food Process Engineering**, v. 24(2), p. 71–85, 2001.

HALE, M. B.; WATERS, M. E. Frozen storage stability of whole and headless freshwater prawns *Machrobranchium rosenbergii*. **Marine Fish Review**, Seattle, v. 42, p. 18-21, 1981.

HAMM, R. Biochemistry of meat hydration. Advances in **Food Research**, v.10, p. 335-443, 1960.

HAVELAAR, A. H.; BRUL, S.; DE JONG, A.; DE JONGE, R.; ZWIETERING, M. H.; TER KUILE, B. H. (2010). Future challenges to microbial food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. 79-94, 2010.

HUI, Y. H.; CORNILLON, P.; LAGARETTA, I. G.; LIM, M. H.; MURREL, K. D.; NIP, W. Handbook of Frozen Foods. Part IV: **Frozen seafoods**. Marcel Dekker Incorporated, New York, v. 133, 1293 p., 2004.

IBRAHIM SALLAM, K. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 566–575, 2007.

OSÓRIO, J. C. S.; OSÓRIO, M. T. M.; JARDIM, P. O. C.; PIMENTEL, M. A.; POUEY, J. L. O.; LÜDER, W. E. Métodos para avaliação de carne ovina “in vivo”, na carcaça e na carne. Pelotas: Ed. Universitária/UFPEL, 1998.

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

QUEIROGA, I. M. B. N.; SILVA, J. A. S.; CAVALHEIRO, J. M. O.; QUEIROGA, R. C. R. E.; BATISTA, A. S. M.; BARRETO, T. A. Qualidade sensorial do camarão *Litopenaeus vannamei* congelado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 1801-1812, 2014.

SHENOUDA, S. Y. K. Theories of Protein Denaturation During Frozen Storage of Fish Flesh. **Advances in Food Research**, v. 26, p. 275–311, 1980.

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

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

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