

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**EFEITO DO REVESTIMENTO DE QUITOSANA ASSOCIADO AO
ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO NA CONSERVAÇÃO DE FILÉS DE
TAMBAQUI**

BRENDA BORGES VIEIRA

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
JULHO – 2017**

EFEITO DO REVESTIMENTO DE QUITOSANA ASSOCIADO AO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO NA CONSERVAÇÃO DE FILÉS DE TAMBAQUI

BRENDA BORGES VIEIRA

Bióloga

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2015.

Dissertação submetida ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.


Orientadora: Prof^a. Dr^a Norma Suely Evangelista-
Barreto

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA


JULHO – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO


COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
BRENDA BORGES VIEIRA



Prof^a. Dr^a. Norma Suely Evangelista-Barreto
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Prof^a. Dr^a. Talita Lopes Honorato
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Prof^a. Dr^a. Eliseth de Souza Viana
Embrapa Mandioca e Fruticultura

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola em
_____.”

*A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos a mim, fazendo esta vida
valer cada vez mais a pena!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus** pela vida, pela força concedida e por esta conquista.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB pela oportunidade de realização da pós-graduação.

A minha orientadora **Norma Evangelista-Barreto**, pelo apoio, confiança e disponibilidade em partilhar sua experiência no meu trabalho, mas principalmente, por toda compreensão.

A todo o grupo do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental – LABMAA e toda a equipe do Núcleo de Estudos de Pesca e Aquicultura - NEPA, pelo carinho, ajuda, prestatividade, companheirismo e alegria, determinantes durante esses dois anos e que sempre lembrarei com muita saudades.

A minha querida mãe **Rita** pelo amor, paciência, apoio e toda dedicação; pois sem o seu apoio nada seria possível.

Ao meu pai, **Guilherme**, por todo o ensinamento.

A minha tia **Nane**, sem palavras pra descrever a sua importância!

Aos meus irmãos, **Jó, Bruna, Bia e Guilherme**, que com pequenas palavras me dão força para continuar vencendo todos os obstáculos em meu caminho.

A meu anjinho **Levi**, pelo simples fato de existir.

Ao meu namorado, **Junior**, pelo seu amor, compreensão e incentivo.

A **Iane, Deise, Elaine e Carlinha** minhas amigas e irmãs de coração, pelo carinho, apoio e paciência. Por todo choro e sorriso compartilhados!

Ao meu amigo **Peu** e a **Seu Bengo** por terem me ajudado a adquirir a matéria prima para a execução do trabalho.

Agradeço também aos meus amigos, escolhidos por Deus e sabiamente acolhidos por mim, pelo simples fato de existirem.

A toda minha linda “**Família Buscapé**”, por todo o incentivo, apoio, companheirismo, paciência e todo amor envolvido.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–CAPES pela concessão da bolsa.

A todos que não citei, mas que sempre me apoiaram contribuindo para mais um **importante passo na minha vitória**.

A todos, muito obrigada!

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Produção brasileira de pescado por região proveviente da aquicultura em 2013.....	25
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Taxa de inibição da quitosana (%) frente a microrganismos patogênicos de interesse alimentar.....	68
--	----

Tabela 2. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo por disco difusão diluição em caldo frente a microrganismos patogênicos de interesse alimentar...	70
--	----

Tabela 3. Efeito do revestimento de quitosana e sua associação com o óleo essencial de cravo em filés de tambaqui contaminados intencionalmente com microrganismos patogênicos, mantidos sob armazenamento refrigerado (4°C) ...	72
---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1. pH das amostras de filés de tambaqui revestidos com quitosana e óleo essencial de cravo sob armazenamento congelado a -18°C	90
--	----

Tabela 2. Valores de umidade (%) das amostras de filés de tambaqui revestidos com quitosana e óleo essencial de cravo sob armazenamento congelado a -18°C	92
--	----

Tabela 3. Teor de lipídeos totais dos filés de tambaqui revestidos com quitosana e óleo essencial de cravo durante armazenamento congelado a -18°C	93
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Esquema geral do mecanismo de oxidação lipídica 30
- Figura 2.** Série histórica de surtos e casos de DVA no Brasil no ano de 2007 a 2015* 32
- Figura 3.** Alimentos incriminados em surtos alimentares no Brasil de 2000 a 2015* 33
- Figura 4.** Estrutura química da quitina e da quitosana 40
- Figura 5.** Reação de desacetilação da quitina, originando a quitosana 41

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Valores de TBARS em MDA eq.kg⁻¹ de filés de tambaqui durante o período armazenado de 120 dias 94
- Figura 2.** Valores médios da contagem de bactérias psicrófilas cultiváveis em filés de tambaqui revestidos com quitosana e óleo essencial de cravo armazenados sob congelamento a -18°C 96
- Figura 3.** Avaliação dos atributos de qualidade dos filés de tambaqui revestidos de quitosana e sua associação com o óleo essencial de cravo 99

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO.....	15
-----------------	----

CAPÍTULO 1

Uso de revestimento antimicrobiano natural na conservação de pescado

Resumo	20
Abstract.....	22
1. Aquicultura	24
2. Pescado e seu valor nutricional.....	25
3. Deterioração do pescado	27
3.1. Oxidação lipídica	29
4. Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA)	31
4.1. Gênero <i>Listeria</i>	34
4.2. Gênero <i>Salmonella</i>	35
4.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	37
4.4. <i>Escherichia coli</i>	38
4.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
5. Antimicrobianos naturais	40
5.1. Quitosana	40
5.2. Óleos essenciais.....	43
REFERÊNCIAS	47

CAPÍTULO 2

Potencial antimicrobiano do revestimento de quitosana associado ao óleo essencial de cravo em filés de tambaqui

Resumo	62
--------------	----

Abstract.....	63
1. Introdução	63
2. Material e métodos.....	65
2.1. Microrganismos e preparo do inóculo	65
2.2. Atividade antimicrobiana da quitosana.....	65
2.3. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo por difusão em disco.....	66
2.4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de cravo.....	66
2.5. Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de cravo	67
2.6. Potencial antimicrobiano do revestimento de quitosana e sua associação com o óleo essencial de cravo em filés de tabaqui contaminados intencionalmente	67
2.7. Análises estatísticas	67
3. Resultados e discussão	68
3.1. Atividade antimicrobiana da quitosana.....	68
3.2. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo	69
3.3. Potencial antimicrobiano do revestimento de quitosana e sua associação com o óleo essencial de cravo em filés de tabaqui contaminados intencionalmente	71
4. Conclusão	75
Agradecimentos	75
REFERÊNCIAS	75

CAPÍTULO 3

Efeito do revestimento de quitosana associado ao óleo essencial de cravo na conservação de filés de tabaqui sob congelamento

Resumo	82
Abstract.....	83
1. Introdução	84
2. Material e métodos.....	86
2.1. Obtenção da quitosana e óleo essencial de cravo	86
2.2. Obtenção e preparação das amostras de tabaqui.....	86
2.3. Preparação da solução de revestimento	86

2.4. Avaliação da vida de prateleira dos filés de tambaqui.....	86
2.4.1. Análises físico-químicas.....	87
2.4.1.1. pH.....	87
2.4.1.2. Umidade.....	87
2.4.1.3. Lipídeos totais.....	88
2.4.1.4. Oxidação lipídica - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	88
2.4.2. Análise microbiológica.....	89
2.4.3. Análise sensorial.....	89
2.5. Análises estatísticas.....	89
3. Resultados e discussão.....	89
3.1. Análises físico-químicas.....	90
3.1.1. pH.....	90
3.1.2. Umidade.....	91
3.1.3. Lipídeos totais.....	92
3.1.4. Oxidação lipídica - TBARS.....	93
3.2. Análise microbiológica.....	96
3.2. Bactérias psicrotróficas cultiváveis.....	96
3.3. Análise sensorial.....	98
3.3.1. Perfil das características sensoriais.....	98
3.3.2. Análise de comparação múltipla.....	99
3.3.3. Ordenação de acordo com a preferência.....	100
4. Conclusão.....	100
Agradecimentos.....	100
REFERÊNCIAS.....	100
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
ANEXOS.....	107

RESUMO

VIEIRA, B. B. Efeito do revestimento de quitosana associado ao óleo essencial de cravo na conservação de filés de tambaqui

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do revestimento de quitosana associado ao óleo essencial de cravo na conservação de filés de tambaqui. Na primeira etapa do experimento foi avaliada a atividade antimicrobiana da quitosana e do óleo essencial de cravo (OEC) com posterior aplicação do revestimento de quitosana associado ao OEC nos filés de tambaqui, contaminados intencionalmente com microrganismos patogênicos. A segunda etapa consistiu na avaliação da vida de prateleira dos filés de tambaqui tratados (solução de quitosana 2% - T1; solução de quitosana 2% + OEC 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ - T2; solução de quitosana 0,5% + OEC 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ - T3; solução de butilhidroxitolueno – BHT 100 mg.mL^{-1} - T4 e água destilada estéril - controle), mantidos sob congelamento (-18°C) por meio de análises físico-químicas (pH, umidade, lipídeos e oxidação lipídica) e microbiológica de bactérias psicrotróficas cultiváveis. A análise sensorial foi realizada por meio do teste de perfil de características, comparação múltipla e ordenação de preferência, sendo aplicada a 40 provadores não treinados. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) só foram observadas para *Listeria monocytogenes* a 2% de quitosana e *Staphylococcus aureus* a 0,25% e 0,5% de quitosana, respectivamente. *Pseudomonas aeruginosa* apresentou uma CIM de 3200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *S. aureus* de 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e *L. monocytogenes* de 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o OEC. Não houve CBM para os microrganismos testados, sendo o óleo bacteriostático. O revestimento de quitosana apresentou inibição de todos os patógenos testados nos filés de tambaqui, no entanto, o sinergismo com o OEC potencializou significativamente o efeito do revestimento ($p < 0,05$). Os tratamentos revestidos com quitosana e quitosana associada ao OEC retardaram efetivamente a oxidação lipídica, inibiram o crescimento de bactérias psicrotróficas cultiváveis e reduziram as alterações físico-químicas, como pH e umidade, durante o congelamento. Os filés tratados foram aceitos pelos provadores, com médias superiores a 4. A maior

preferência dos provadores foi pelos filés sem adição do OEC. O revestimento de quitosana associado ao OEC é promissor para ser utilizado como conservante natural, visando o controle de patógenos e aumento da vida útil dos filés de tambaqui.

Palavras-chaves: pescado, *Colossoma macropomum*, antimicrobianos naturais.

ABSTRACT

VIEIRA, B. B. Effect of chitosan coating associated with clove essential oil on the conservation of tambaqui fillets

The objective of this work was to evaluate the effectiveness of the chitosan coating associated with clove essential oil in the conservation of tambaqui fillets. In the first stage of the experiment the antimicrobial activity of chitosan and clove essential oil (OEC) was evaluated with the application of chitosan coatings associated with OEC in fillets of tambaqui, intentionally contaminated with pathogenic microorganisms. The second step consisted of evaluating the shelf life of the treated tambaqui fillets (chitosan solution 2% - T1; chitosan solution 2% + OEC 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ - T2; chitosan solution 0,5% + OEC 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ - T3; BHT 100 mg.mL^{-1} - T4 and sterile control distilled water), kept under freezing (-18°C) by means of physico-chemical analyzes (pH, moisture, lipids and lipid oxidation) and microbiological of arable psychrotrophic bacteria. The sensorial analysis was performed through the characteristic profile test, multiple comparison and preference ordering, being applied to 40 untrained testers. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were only observed for *Listeria monocytogenes* at 2% chitosan and *Staphylococcus aureus* at 0,25% and 0,5% chitosan, respectively. *Pseudomonas aeruginosa* presented a MIC of 3200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* and *S. aureus* of 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and *L. monocytogenes* of 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for OEC. There was no CBM for the microorganisms tested, being the bacteriostatic oil. The chitosan coating showed inhibition of all pathogens tested on tambaqui fillets, however, synergism with OEC significantly potentiated the coating effect ($p < 0.05$). The OEC-associated chitosan and chitosan coated treatments effectively retarded lipid oxidation, inhibited the growth of psychrotrophic arable bacteria, and reduced physico-chemical changes, such as pH and moisture, during freezing. The treated steaks were accepted by the tasters, with averages superior to 4. The most preferred of the tasters was by the fillets without addition of the OEC. The chitosan

coating associated with OEC is promising to be used as a natural preservative, aiming to control pathogens and increase the shelf life of tambaqui fillets.

Keywords: fish, *Colosoma macropomum*, natural antimicrobials.

INTRODUÇÃO

A tendência mundial por alimentos mais saudáveis e o crescimento populacional vêm fazendo com que haja um aumento no consumo de pescado (SARTORI; AMANCIO, 2012; FAO, 2014). A aquicultura é uma das principais atividades responsáveis pela produção de pescado para consumo humano no mundo, com produção total de 72,5 milhões de toneladas em 2014, antecedido pela pesca com 73,8 milhões de toneladas. No Brasil, dos 1,2 milhão de toneladas de pescado produzidas, 477 mil toneladas tiveram origem da aquicultura (BRASIL, 2015a; FAO, 2016).

O pescado constitui uma das principais fontes de proteína da alimentação humana, caracterizado por seu elevado valor biológico. Destaca-se nutricionalmente de outros alimentos de origem animal, quanto à quantidade e qualidade de suas proteínas, à presença de vitaminas e minerais e, principalmente, por ser fonte de ácidos graxos essenciais (SARTORI; AMANCIO, 2012).

Apesar da elevada importância nutricional, o pescado é o alimento de origem animal com maior suscetibilidade a deterioração, por apresentar pH próximo a neutralidade, elevada atividade de água nos tecidos, alto teor de nutrientes facilmente utilizáveis pelos microrganismos, acentuado teor de fosfolípidios e rápida ação destrutiva das enzimas presentes nos tecidos e vísceras do animal (GASPAR; VIEIRA; TAPIA, 1997; LEITÃO et al., 1997). Em virtude disso, a preservação desse alimento pode ser alcançada por meio da utilização de métodos tradicionais de conservação, como a salga, refrigeração e o congelamento, que não inibem completamente sua deterioração (GONÇALVES, 2011).

Visando prolongar ainda mais a vida de prateleira de peixes e produtos da pesca, várias estratégias envolvendo atmosfera modificada e agentes antimicrobianos naturais têm sido propostas para inibir o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e a atividade enzimática e oxidativa (ARKOUDELOS; STAMATIS; SAMARAS, 2007; PANTAZI et al., 2008).

Devido à elevada presença de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, o pescado é considerado um alimento altamente suscetível a sofrer reações de oxidação, um mecanismo importante que leva à deterioração do pescado. A oxidação dos lipídios no pescado acarreta redução da vida útil devido a mudanças no sabor, odor, degradação da textura e redução da qualidade nutricional (ABREU et al., 2010).

A quitosana, um polímero natural obtido da carapaça de crustáceos e parede celular de fungos, tem se destacado devido às suas propriedades biodegradáveis, abundância e sua baixa toxicidade ao homem (AZEVEDO et al., 2007). A quitosana tem sido empregada em diversas aplicações, como no tratamento de águas residuais, purificação da água, clarificação e desacidificação de sucos de frutas, formação de filmes e revestimentos biodegradáveis e na preservação de alimentos como agente conservante (VÁSCONEZ et al., 2009).

Os revestimentos de quitosana vêm alcançando espaço nas novas tecnologias alimentícias devido à sua propriedade de barreira, evitando a perda de umidade, absorção de água pela matriz e a penetração do oxigênio, a perda de aromas, o transporte de solutos e o desenvolvimento de microrganismos, conseqüentemente, estendendo a vida útil do produto (HOSSEINI et al., 2013). Esses revestimentos quando adicionados ou combinados com outros compostos antioxidantes ou antimicrobianos naturais, como os óleos essenciais, potencializam a sua funcionalidade, por meio da sua liberação lenta e gradual na superfície do produto (SCHENATO, 2010).

O óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) é extraído de uma especiaria apreciada desde a antiguidade, não só por seu sabor e qualidade culinária, mas também por sua utilização aromática, terapêutica e medicinal. Sua composição química é constituída principalmente pelo eugenol, um composto antioxidante e antimicrobiano que conserva os alimentos (AFONSO et al., 2012).

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é a segunda espécie de peixe de água doce mais cultivada no Brasil, sendo caracterizado por seu rápido padrão de crescimento, alta produtividade e rusticidade (ARAUJO-LIMA; GOULDING, 1998; IBGE, 2013). Nas últimas décadas, vem se tornando uma das principais espécies nativas para piscicultura brasileira, de valor econômico significativo para região

Norte e Nordeste (VAL; ALMEIDA-VAL, 1995). Sua carne apresenta excelente sabor e suculência, devido à presença de altos teores de lipídeos em sua composição. Essa característica torna seus filés mais suscetíveis às reações oxidativas que deterioram os lipídeos, produzindo sabor e odor de ranço (FOGAÇA et al., 2014).

Assim, a aplicação de revestimentos de quitosana nos filés de tambaqui busca melhorar a conservação do alimento mantendo suas características nutricionais e sensoriais. Além disso, a utilização de quitosana com a adição de óleos essenciais, como o óleo essencial de cravo, traz uma nova abordagem na aplicação de revestimentos edíveis em alimentos.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar o efeito do revestimento de quitosana associado ao óleo essencial de cravo na conservação de filés de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Objetivos específicos

1. Avaliar a atividade antimicrobiana in vitro da quitosana e do óleo essencial de cravo frente a microrganismos Gram negativos e Gram positivos;
2. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) da quitosana e do óleo essencial de cravo;
3. Verificar o efeito antimicrobiano da quitosana associado ao óleo essencial de cravo no revestimento de filés de tambaqui frente a microrganismos Gram positivo e Gram negativos contaminados intencionalmente.
4. Realizar análises físico-químicas dos filés de tambaqui submetidos ao revestimento com quitosana associado ao óleo essencial de cravo durante o armazenamento sob congelamento;
5. Analisar o efeito antioxidante do revestimento de quitosana associado ao óleo essencial de cravo nos filés de tambaqui;
6. Avaliar a qualidade microbiológica dos filés de tambaqui revestidos com quitosana associado ao óleo essencial de cravo.
7. Realizar análise sensorial dos filés revestidos com quitosana associado ao óleo essencial de cravo.

CAPÍTULO 1

Revisão de literatura: Uso de revestimento antimicrobiano natural na conservação de pescado

RESUMO

VIEIRA, B. B. Uso de revestimento antimicrobiano natural na conservação de pescado

A aquicultura é uma prática tradicional de cultivo de organismos aquáticos, sendo responsável por praticamente metade da produção de pescado consumido no mundo. Devido a tendência mundial pelo consumo de alimentos mais saudáveis, a demanda por pescado vem crescendo de forma acelerada. O pescado é um componente extremamente importante na dieta humana, de alta digestibilidade, rico em nutrientes com proteínas de alto valor biológico, ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas e minerais. Apesar de possuir elevada importância do ponto de vista nutricional é o alimento de origem animal com condições mais favoráveis à deterioração, devido as suas características intrínsecas como pH próximo a neutralidade, elevada atividade de água, alto teor de nutrientes e presença de enzimas nos tecidos e vísceras. A preservação desse alimento pode ser alcançada por meio da utilização de métodos tradicionais de conservação, porém, individualmente, não inibem completamente sua deterioração. Em algumas situações, o pescado ainda pode servir como importante via de transmissão de agentes infecciosos, sendo responsáveis por surtos de doenças veiculadas por alimentos ocorridos nos últimos anos no Brasil. O uso de conservantes químicos em pescado serve com uma forma de retardar o processo de deterioração e impedir o desenvolvimento de microrganismos, no entanto, é um prática discutida e polêmica. Se por um lado seu uso é imprescindível, por outro a incerteza de ambos os estudos negativos e positivos relacionados à toxicidade de muitas destas substâncias gera controvérsias. Nesse sentido, a busca de compostos alternativos para emprego como conservantes naturais em pescado tem a finalidade de atender às perspectivas do consumidor quanto ao aspecto sensorial e prolongar a vida de prateleira com segurança, tanto do aspecto microbiológico como químico. A quitosana, um polissacarídeo catiônico, tem atraído a atenção como potencial conservante em alimentos por ser de origem natural, atóxico e apresentar atividade biológica como antioxidante e

antimicrobiano. Sua aplicação nos alimentos se dá por meio da aplicação de revestimentos, por aspersão ou imersão ou por elaboração de biofilmes ativos, incorporados ou não de outros agentes antimicrobianos. Dentre esses agentes antimicrobianos, o óleo essencial de cravo têm sido considerado uma fonte segura de antimicrobianos naturais, por não apresentar risco à saúde dos consumidores. Assim, a utilização da quitosana como revestimento edível associado a óleos essenciais, como o óleo essencial de cravo, visa prolongar a vida útil do pescado, além de atribuir características organolépticas desejáveis.

Palavras chave: aquicultura, pescado, quitosana, óleo essencial de cravo.

ABSTRACT

VIEIRA, B. B. Use of natural antimicrobial coating in fish conservation

Aquaculture is a traditional practice of growing aquatic organisms, accounting for almost half of the world's fish production. Due to the worldwide trend of consumption of healthier foods, the demand for fish has been increasing rapidly. Fish is an extremely important component in the human, high digestibility, nutrient rich diet with high biological value proteins, polyunsaturated fatty acids, vitamins and minerals. Although it is of high nutritional importance, it is the food of animal origin with conditions more favorable to deterioration, due to its intrinsic characteristics such as pH close to neutrality, high water activity, high nutrient content and the presence of enzymes in the tissues and viscera. The preservation of this food can be achieved through the use of traditional methods of conservation, but individually, do not completely inhibit its deterioration. In some situations, fish can still serve as an important route of transmission of infectious agents, being responsible for outbreaks of food-borne diseases that occurred in recent years in Brazil. The use of chemical preservatives in fish serves as a way to delay the deterioration process and prevent the development of microorganisms, however, it is a controversial and controversial practice. If on the one hand its use is imperative, on the other the uncertainty of both negative and positive studies related to the toxicity of many of these substances raises controversies. In this sense, the search for alternative compounds for use as natural preservatives in fish has the purpose of meeting the consumer's perspective on the sensory aspect and extending the shelf life with safety, both microbiological and chemical. Chitosan, a cationic polysaccharide, has attracted attention as a potential food preservative because it is of natural origin, nontoxic and presents biological activity as antioxidant and antimicrobial. Its application in food is through the application of coatings, by spraying or immersion or by the preparation of active biofilms, incorporated or not of other antimicrobial agents. Among these antimicrobial agents, clove essential oil has been considered a safe source of natural antimicrobials, since it poses no risk to the health of consumers. Thus, the use of

chitosan as a edible coating associated with essential oils, such as clove essential oil, is intended to extend the shelf life of the fish and to confer desirable organoleptic characteristics.

Keywords: Aquaculture, fish, chitosan, clove essential oil.

1. Aquicultura

A aquicultura é uma prática tradicional de longa data, encontrada em várias culturas pelo mundo. Atualmente, é definida como uma atividade multidisciplinar, referente ao cultivo de diversos organismos aquáticos, incluídos neste contexto plantas aquáticas, moluscos, crustáceos e peixes, sendo que a intervenção ou manejo no processo de criação desses organismos é imprescindível para o aumento da sua produção (OLIVEIRA, 2009a).

A demanda mundial por pescado vem crescendo de forma acelerada em decorrência do aumento populacional e da busca por alimentos mais saudáveis (FAO, 2014). O consumo de pescado per capita a nível mundial registrou aumento de 9,9 kg em 1960, 14,4 kg em 1990 e 19,7 em 2013, com estimativa que aponta um aumento superior a 20 kg em 2015 (FAO, 2016). Essa tendência pelo consumo de alimentos saudáveis vem sendo observada e, atualmente, quase metade da produção de pescado já é originada da aquicultura. Assim, o aumento do consumo per capita de pescado será cada vez mais dependente da disponibilidade dos produtos da aquicultura e sua capacidade de adequação às exigências do mercado consumidor (ROCHA et al., 2013).

A produção global de pescado em 2014 foi de 167,2 milhões de toneladas, de acordo com a FAO (2016), dos quais 146,3 milhões de toneladas foram utilizados no consumo humano. Dos 146,3 milhões de toneladas, 73,8 milhões de toneladas (50,4%) tiveram origem da pesca, enquanto 72,5 milhões (49,6%) de toneladas tiveram origem da aquicultura. Além disso, na publicação *Fish to 2030*, a FAO estima que em 2030 a aquicultura seja responsável por mais de 60% da produção mundial de pescado para o consumo humano. Assim, a tendência dos últimos anos deve continuar nas próximas décadas, com a aquicultura sendo a maior responsável por atender a crescente demanda de pescado em nível mundial (FAO, 2014).

Dentre os países com maior potencial para a aquicultura, o Brasil tem papel de destaque pelas condições naturais, clima favorável e pela sua matriz energética. Este potencial está relacionado à sua costa oceânica de mais de oito mil quilômetros, à sua Zona Econômica Exclusiva de 3,5 milhões de km² e à sua dimensão territorial, que dispõe de, aproximadamente, 13% da água doce do

planeta (ROCHA et al., 2013). Possui ainda características regionais bastante específicas no campo social, econômico e geográfico, possuindo um mercado consumidor em potencial para produtos provenientes da aquicultura (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008).

No Brasil, a produção total foi de aproximadamente 1.241.807 de toneladas de pescado conforme dados divulgados pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) em 2013, sendo que, destas, 765.287 toneladas foram de origem da pesca (61,6%) e 476.512 toneladas de origem da aquicultura (38,4%) (BRASIL, 2015a).

A aquicultura representa números oficiais que apontam o Sul e o Nordeste como as principais regiões produtoras de pescado, correspondendo juntas a 52,09% da produção aquícola nacional em 2013 (Tabela 1). As regiões Centro-Oeste e Norte são responsáveis por 37,36% da produção, a região Sudeste tem a menor participação na produção nacional, com 12,55%, segundo estatísticas oficiais publicadas pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2015a).

Tabela 1. Produção brasileira de pescado por região proveniente da aquicultura em 2013.

Região	Produção (t)
Nordeste	140.748
Sul	107.448
Centro-Oeste	105.010
Norte	73.009
Sudeste	50.297
Total	476.512

Fonte: MPA/IBGE (BRASIL, 2015a).

2. Pescado e seu valor nutricional

Por definição, o termo pescado abrange, segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal, por meio do Decreto nº 30.691, de 1952: peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios e quelônios, habitantes dos meios aquáticos de origem fluvial, marinha ou estuarina, desde que destinados à alimentação humana (BRASIL, 1952; GONÇALVES, 2011).

Os peixes e os produtos obtidos por meio da atividade da pesca destacam-se nutricionalmente de outros alimentos de origem animal (SARTORI; AMANCIO, 2012). Representa uma das principais fontes de proteína na alimentação humana, caracterizado por sua elevada digestibilidade, acima de 95%, superior a das carnes em geral e alto valor biológico, sendo o alimento mais saudável do ponto de vista nutritivo (ORDÓÑEZ, 2005). Com relação à quantidade e à qualidade das proteínas do pescado, o teor é sempre alto, variando entre 15% e 25% (GERMANO; GERMANO, 2008).

O pescado é composto basicamente por água, lipídios e proteínas, cujas quantidades variam entre as espécies. Contêm grandes quantidades de vitaminas lipossolúveis A e D, minerais, cálcio, fósforo, ferro, cobre e selênio. A composição lipídica é considerada de elevada proporção de ácidos graxos poli-insaturados, mais de 40%, o que impacta tanto na saúde, quanto na tecnologia aplicada durante o processamento destes alimentos. As proteínas contêm todos os aminoácidos essenciais para o ser humano e têm elevado valor biológico. Adicionalmente, são excelentes fontes de aminoácidos como lisina, metionina e cisteína (FAO, 2005).

O pescado é a carne mais demandada mundialmente e a de maior valor de mercado (SIDONIO et al., 2012; ROCHA et al., 2013). Porém, no Brasil, seu consumo ainda é considerado baixo comparado a média mundial de 19,7 kg por habitante/ano em 2013 (FAO, 2016). Mesmo tendo aumentado nos últimos anos para 11,1 kg por habitante/ano, este valor encontra-se abaixo do mínimo recomendado pela Organização Mundial de Saúde, que é de 12 kg por habitante/ano (BRASIL, 2013). Possíveis motivos são os preços elevados e a baixa qualidade, resultante de problemas de manipulação na comercialização in natura, conservação e armazenamento (SARTORI; AMANCIO, 2012).

Os benefícios nutricionais provenientes do consumo de pescados são atribuídos à presença dos ácidos graxos ômega-3, principalmente EPA (eicosapentaenoico) e DHA (docosaenoico). Entre os efeitos fisiológicos nos humanos, estão a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, hipertensão, inflamações em geral, asma, artrite, psoríase e vários tipos de câncer. O EPA relaciona-se principalmente com a proteção da saúde cardiovascular e o DHA é considerado fundamental para o desenvolvimento do

cérebro e sistema visual, associado à saúde materno infantil (ZAMBOM; SANTOS; MODESTO, 2004).

3. Deterioração do pescado

Entre os produtos de origem animal, o pescado representa um dos mais suscetíveis ao processo de deterioração (SOARES; GONÇALVES, 2012). É composto basicamente por água, lipídios e proteínas, sendo um dos alimentos mais perecíveis, necessitando de cuidados adequados de manipulação, desde a captura até o consumo ou industrialização (ABREU et al., 2008).

A maior probabilidade de deterioração ocorre pelo pescado apresentar pH próximo a neutralidade, elevada atividade de água nos tecidos, alto teor de nutrientes facilmente utilizáveis pelos microrganismos, acentuado teor de fosfolipídios e rápida ação destrutiva das enzimas presentes nos tecidos e nas vísceras do peixe (SOARES; GONÇALVES, 2012). Além disso, apresenta o conteúdo de aminoácidos livres e bases voláteis nitrogenadas relativamente alto quando comparado a outras carnes. O alto conteúdo de compostos nitrogenados de baixo peso molecular, associado a outros fatores, torna o pescado extremamente sensível à microbiota deteriorante (VÁSCONEZ et al., 2009; CHAHAD et al., 2012). Dentre os processos que causam a deterioração do pescado tem-se: a ação de enzimas autolíticas, oxidação lipídica e a atividade bacteriana. De todos, os microrganismos constituem os principais responsáveis pelo surgimento das alterações (RIBEIRO et al., 2009).

A deterioração de peixes segue normalmente três estágios: *rigor mortis*, autólise (perda do frescor) e deterioração microbiana. Esses estágios acontecem rápido ou lentamente dependendo da espécie, condição fisiológica do peixe, contaminação microbiana e temperatura (OCAÑO-HIGUERA et al., 2009).

O *rigor mortis* é caracterizado pelo enrijecimento do músculo como resultado do esgotamento de trifosfato de adenosina (ATP) logo após a morte do animal, havendo hidrólise dos compostos orgânicos, sendo o principal deles o glicogênio, que hidrolisa rapidamente e produz o acúmulo de ácido láctico no músculo e redução do pH (6,5) (BEIRÃO et al., 2004). Ao término dessa fase, tem-se início

as fases de deterioração enzimática e bacteriana (SOARES; GONÇALVES, 2012).

O processo autolítico é realizado por enzimas endógenas lipolíticas e proteolíticas presentes no músculo e responsáveis pela perda inicial da qualidade do peixe fresco. Quando ainda vivo, a pele dos peixes atua como uma barreira mecânica à penetração de microrganismos, razão pela qual seu músculo é considerado estéril. Após a morte, a autólise se instala, a pele torna-se permeável e o pescado vulnerável ao ataque microbiano (LEITÃO, 1977). Ao mesmo tempo, há a liberação de açúcares simples, aminoácidos livres e outras substâncias, como amônia, tornando o meio rico ao desenvolvimento microbiano (FRANCO; LANDGRAF, 2005)

A deterioração microbiana é, sem dúvida, a mais importante e se instala a partir da superfície da pele, das brânquias e do trato intestinal do pescado por meio de sua microbiota (VIEIRA, 2004). Segundo Franco e Landgraf (2005), dentre os gêneros de microrganismos que fazem parte da microbiota natural do pescado, podem ser citados *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Vibrio* e *Micrococcus*. Os gêneros mais importantes na deterioração de peixes são *Pseudomonas* e *Shewanella*, principais responsáveis pelas alterações sensoriais do pescado devido à formação de trimetilamina, ésteres, substâncias voláteis reductoras e outros compostos. Esses gêneros são importantes, não somente por sua natureza psicrotrófica, mas principalmente pela capacidade de utilização de substâncias nitrogenadas não proteicas (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

A deterioração do pescado é um processo metabólico que causa alterações organolépticas indesejáveis, apesar de não ser a causa de doenças de origem alimentar. As mudanças na aparência, sabor, odor e consistência do músculo são questões que afetam a qualidade dos peixes (DOYLE; BEUCHAT, 2007). No processo de deterioração tem-se observado que as condições de captura, manipulação e processamento determinam a velocidade aos quais essas alterações podem acontecer, sendo a temperatura o fator de maior impacto (OCAÑO-HIGUERA et al., 2009).

A vida útil do pescado se refere ao intervalo de tempo em que o produto pode ser conservado em determinadas condições de temperatura, umidade relativa, luminosidade, oxigênio, etc., de forma a garantir seus atributos sensoriais e nutricionais (GONÇALVES, 2011). No intervalo decorrido da captura até o processamento ou comercialização, o pescado se encontra sujeito a perdas de qualidade físico-química, sensorial e microbiológica, devido às condições de armazenamento a bordo e à natureza da sua composição, podendo haver alterações nas características químicas, físicas ou microbiológicas, que resultam em alterações sensoriais (SOARES; GONÇALVES, 2012).

Como forma de minimizar ou retardar os processos de deterioração decorrentes em pescados, as indústrias vêm buscando melhorar as tecnologias de conservação dos alimentos, como o uso de antimicrobianos naturais e atmosfera modificada, para que assim se obtenha um produto final com a melhor qualidade possível (ARKOUDELOS; STAMATIS; SAMARAS, 2007; PANTAZI et al., 2008).

3.1. Oxidação lipídica

Os lipídeos são um grupo de compostos heterogêneos que tem em comum a insolubilidade em água e solubilidade em solventes orgânicos. Compreendem as gorduras, óleos, ceras e compostos relacionados e se encontram distribuídos em todos os tecidos, principalmente nas membranas celulares e nas células de gordura (DUTRA-DE-OLIVEIRA; MARCHINI, 2010). Dentre os lipídeos, se destacam os triacilglicerídeos que possuem longas cadeias carbônicas ligadas a moléculas de glicerina. Os óleos e gorduras são suscetíveis ao processo de oxidação devido a determinadas características químicas, como presença de insaturações e cadeia longa dos ácidos graxos que compõem os triacilglicerídeos (GUNSTONE, 2008).

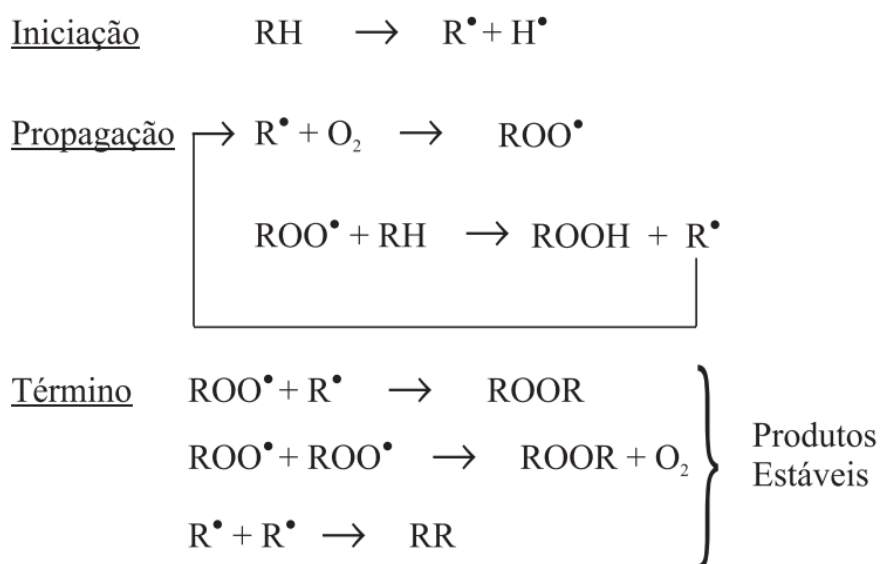
A reação espontânea do oxigênio atmosférico com os lipídios, conhecida como auto-oxidação ou oxidação lipídica, é o processo mais comum que leva à deterioração oxidativa (CAETANO, 2009). O processo oxidativo é o processo primário de deterioração da qualidade do pescado que resulta em mudanças no sabor, perda de cor e de nutrientes, possível produção de compostos tóxicos,

causando também a degradação das proteínas da carne, pigmentos e redução da qualidade nutricional, o que limita a vida útil (ABREU et al., 2010).

No músculo, a rancificação da gordura é causada por compostos químicos ou espécies reativas ao oxigênio que causam quebra das ligações duplas nas frações fosfolipídicas das membranas celulares, que no caso dos peixes são mais suscetíveis porque possuem maior grau de insaturação (RUFF et al., 2002).

A oxidação lipídica está associada à reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados e ocorre em três fases: iniciação, propagação e término (Figura 1). A iniciação ocorre a formação dos radicais livres do ácido graxo devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico, em condições favorecidas pela luz e calor. A propagação inicia-se quando os radicais livres, suscetíveis ao oxigênio atmosférico, são convertidos em outros radicais aparecendo os produtos primários da oxidação como os peróxidos e hidroperóxidos. Os radicais livres formados atuaram como propagadores da reação. Na fase de término, dois radicais combinam-se, com a formação de produtos estáveis obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (TOLEDO; ESTEVES; HARTMANN; 1985; RAMALHO; JORGE, 2006).

Figura 1. Esquema geral do mecanismo de oxidação lipídica.



RH – ácido graxo insaturado; R[•] - radical livre; ROO[•] - radical peróxido e ROOH – hidroperóxido.

Fonte: (RAMALHO; JORGE, 2006)

Algumas medidas são necessárias para atrasar o declínio da qualidade do pescado e estender a vida útil dos peixes através da redução da taxa de oxidação lipídica (SONG et al., 2011). Os antioxidantes são adicionados aos alimentos para retardar o início ou desacelerar a taxa de oxidação do produto. No entanto, os antioxidantes sintéticos usados podem trazer riscos à saúde de seres humanos por serem potencialmente carcinogênicos (ABREU et al., 2010).

A aplicação de películas e revestimentos antioxidantes naturais nos peixes pode ser benéfica, uma vez que esses produtos contêm gorduras facilmente oxidáveis. O nível de oxidação de lipídeos no pescado é frequentemente avaliado medindo substâncias como as que são reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo expressas como conteúdo de malonaldeído (BONILLA et al., 2012). As substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) são desenvolvidas como subproduto da oxidação dos lipídeos e podem ser medidas pelo ensaio TBARS usando o ácido tiobarbitúrico como reagente (JANERO, 1990).

4. Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA)

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA) abrangem enfermidades do mais amplo espectro, e, além de ser um problema crescente de saúde pública em todo o mundo, são resultados da ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos, toxinas de microrganismos, parasitas, substâncias químicas, objetos lesivos ou que contenham em sua constituição estruturas naturalmente tóxicas (BRASIL, 2015b). Essa contaminação pode ocorrer em qualquer fase do processo de produção até o consumo, principalmente através do meio ambiente, incluindo a poluição da água, solo ou ar (BRASIL, 2004).

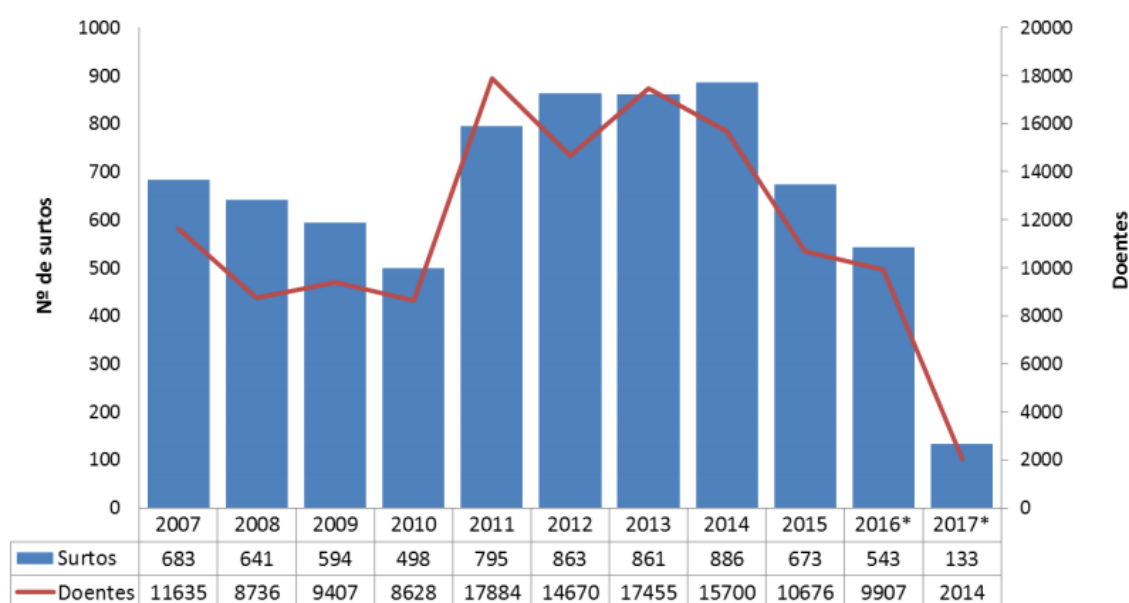
A ocorrência de DVA vem aumentando de modo significativo em nível mundial. Vários são os fatores que contribuem para a emergência dessas doenças, entre os quais destacam-se: o crescente aumento das populações; a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos; o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande

escala. Contribui ainda, o deficiente controle dos órgãos públicos e privados quanto à qualidade dos alimentos ofertados às populações (BRASIL, 2010).

Muitos alimentos têm sido relacionados como causas das DVA e infecções, no entanto, as pesquisas normalmente restringem-se a constatar a presença daquelas bactérias patogênicas clássicas, como a *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum* (COSTA, 2006).

O surto alimentar por DVA é definido como um incidente em que duas ou mais pessoas apresentam uma enfermidade semelhante após a ingestão de um mesmo alimento ou água, com as análises epidemiológicas apontando para a mesma origem da enfermidade. Dados atuais sobre a incidência de surtos alimentares no Brasil mostram que no ano de 2014, foram registrados 886 surtos de DVA e 15.700 casos contra 575 surtos e 9.267 casos no ano de 2015 (Figura 2). Até o mês de janeiro de 2016, o número de surtos ocorridos em 2015 está acima da metade comparando com o ano de 2014 (BRASIL, 2015c).

Figura 2. Série histórica de surtos e casos de DVA no Brasil no ano de 2007 a 2015*.

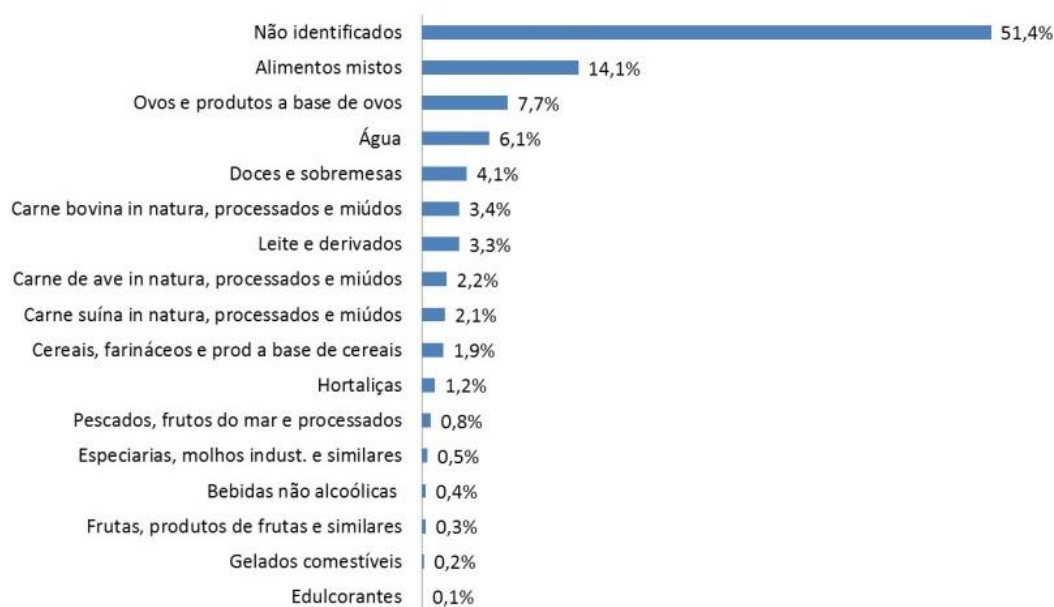


*Dados sujeitos a alteração.

Fonte: SINAN/SVS/Ministério da Saúde (BRASIL, 2017)

Em algumas situações, o pescado pode servir como importante via de transmissão de agentes infecciosos, sendo responsáveis por 0,8% dos surtos de DVA ocorridos no Brasil do ano de 2000 a 2015 (Figura 3). O peixe vivo apresenta contaminação bacteriana principalmente na pele, brânquias e escamas, passando aos demais tecidos após a morte do animal. Desta forma, a manipulação indevida e a não utilização de medidas higiênicas durante o transporte, manuseio e conservação podem facilitar o desenvolvimento dos patógenos, presentes no próprio pescado ou provenientes do ambiente (FAO, 2010).

Figura 3. Alimentos incriminados em surtos alimentares no Brasil de 2000 a 2015*.



*Dados sujeitos a alteração.

Fonte: SINAN/SVS/Ministério da Saúde (BRASIL, 2016)

As bactérias patogênicas presentes no pescado podem ser divididas em dois grupos: bactérias do meio ambiente e as bactérias oriundas de contaminação. As bactérias do meio ambiente são *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Aeromonas* sp. e *Listeria* sp.. Já as bactérias por contaminação

são *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Shigella* (HUSS, 1997).

A legislação brasileira vigente, de acordo com a RDC nº 12 de 2001, preconiza como medida de segurança à presença de microrganismos em pescado in natura, resfriados ou congelado valores limites à presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, dentre os quais se encontra *S. aureus* de 10^3 UFC.g⁻¹ e ausência de *Salmonella* sp. em 25 g de pescado (BRASIL, 2001).

Oliveira et al. (2010) relataram que a maioria dos surtos diarreicos tem sido relacionado à ingestão de alimentos com boa aparência, sabor e odor normais, sem qualquer alteração sensorial visível. Isso ocorre porque a dose infectante de patógenos alimentares geralmente é menor que a quantidade de microrganismos necessária para degradar os alimentos, esse fato dificulta o rastreamento dos alimentos causadores de surtos.

4.1. Gênero *Listeria*

O gênero *Listeria* compreende as espécies *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria grayi*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, e as mais recentemente reconhecidas *Listeria marthii*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria weihenstephanensis* e *Listeria fleischmannii* (BERTSCH et al., 2013; LANG et al., 2013). No entanto, somente são consideradas patogênicas para humanos e animais as espécies *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii* (PAGADALA et al., 2012).

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram positiva, em forma de bacilo pequeno e regular, anaeróbia facultativa, móvel com flagelos peritríquios e não formadora de esporos (CAMEJO et al., 2011). Esta bactéria é ubíqua no meio ambiente e é frequentemente encontrada em fezes de animais, solo, vegetação em decomposição, plantas e água corrente.

Em idosos e imunocomprometidos, a listeriose manifesta-se principalmente sob forma de infecção do sistema nervoso central, como meningite e infecção sanguínea generalizada. Nas grávidas, os sintomas confundem-se muitas vezes com síndrome gripal, ocorrendo a propagação da infecção da mãe ao feto, podendo provocar aborto ou nascimento de bebês com patologias graves (KETO-

TIMONEN, 2008). O período infeccioso da listeriose pode ter uma duração de 20 a 30 dias (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Listeria monocytogenes representa uma preocupação constante para as indústrias de alimentos e órgãos oficiais de regulamentação, pois possui habilidade de sobreviver em condições adversas e tem capacidade de crescer em temperaturas de refrigeração, resistir ao congelamento e aos diversos antimicrobianos, tornando um dos microrganismos de grande importância entre os patógenos veiculados por alimentos, através do consumo de pescados (GANDHI; CHIKINDAS, 2007; GONÇALVES, 2011).

Este microrganismo apresenta como habitat natural a água, portanto, estão provavelmente presentes na superfície externa de peixes em águas contaminadas. *Listeria monocytogenes* foi detectada por Gudmundsdottir et al. (2006) na superfície de peixes e no revestimento do estômago, brânquias e intestinos de peixes porém a carne é geralmente livre do microrganismo, a menos que tenha sido contaminado a partir de diferentes fontes.

4.2. Gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e é composto por duas espécies *Salmonella enterica*, com seis subespécies e *Salmonella bongori* (BHOWMICK et al., 2011). Ressalta-se que existem aproximadamente 2.610 sorovares considerados patógenos potenciais a animais e humanos (TESSARI et al., 2012), aos quais são divididos em três grupos conforme o grau de adaptação ao hospedeiro: *Salmonella* tifóide (enterica), causadora da febre tifóide e para-tifóide, geralmente não são patogênicas para animais; *Salmonella* não-tifóide, causa gastroenterite em diversos animais, incluindo humanos; e *Salmonella* restrita a aves e ovinos (GREIG; RAVEL, 2009).

Compreende bactérias Gram negativas, geralmente móveis, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, catalase positivas, oxidase negativas, desenvolvendo-se no intervalo de temperatura entre 5°C e 47°C, porém apresentam crescimento ótimo na faixa de 35°C a 37°C (FRANCO; LANDGRAF, 2005). São frequentemente encontradas no trato intestinal de diversos animais,

incluindo pássaros e homens, podendo contaminar o pescado durante seu processamento (NORHANA et al., 2010).

A doença causada por *Salmonella*, a salmonelose, é uma das principais zoonoses para a saúde pública em todo o mundo (LOURENÇO; REIS; VALLS, 2004), exteriorizando-se pelas suas características de endemicidade, alta morbidade e, sobretudo, pela dificuldade da adoção de medida no seu controle (GUERIN; VOLD; VILTSLAND, 2005). Além da importância das medidas preventivas para evitar o risco de infecção da salmonelose na população humana, o controle desta doença é de grande interesse para a economia dos países em que ocorrem esses surtos (SHINOHARA et al., 2008).

A febre tifoide, causada pela *Salmonella* Typhi, apresenta sintomas muito graves e incluem septicemia, febre alta, diarreia e vômitos. Após a infecção, os indivíduos podem se tornar portadores por meses ou anos, constituindo então uma fonte contínua de infecção. O período de incubação usualmente varia de 7 a 21 dias e a duração da doença pode chegar a oito semanas. A febre entérica, o agente etiológico é a *Salmonella* Paratyphi, os sintomas clínicos são mais brandos que em relação à febre tifóide, podendo evoluir para septicemia e freqüentemente desenvolver um quadro de gastroenterite, febre e vômitos. O período de incubação é usualmente de 6 a 48 horas e a duração média da doença é de três semanas. E as salmoneloses causadas por outras salmonelas desenvolvem um quadro de infecção gastrointestinal, tendo como sintomas dores abdominais, diarreia, febre baixa e vômito, sendo raro os casos clínicos fatais. Os sintomas aparecem de 12 a 36 horas, podendo durar os sintomas até 72 horas (FRANCO; LANDGRAF, 2005; CONNOR; SCHWARTZ, 2005; JAWETZ; ADELBERG, 2006).

Devido *Salmonella* encontrar-se cada vez mais envolvida em surtos de doenças veiculadas por alimentos, com efetiva participação do pescado, alertas para a necessidade de medidas de controle na higiene dos manipuladores, durante o manuseio e processamento são necessárias, evitando contaminação cruzada por meio de utensílios e equipamentos, contribuindo para redução dos níveis de contaminação do produto (VIEIRA, 2004).

4.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus apresenta-se como cocos Gram positivos, agrupados em cachos irregulares, isolados, em pares ou tétrades. É imóvel, catalase positiva, coagulase positiva e não formador de esporos. Considerado um microrganismo mesófilo com temperatura de crescimento entre 7° e 47,8°C, podendo produzir enterotoxinas termorresistentes. Este microrganismo tem a capacidade de sobreviver e multiplicar em uma concentração de cloreto de sódio de até 15% e é o único capaz de se multiplicar em alimentos com valores de atividade de água (aw) inferiores a 0,86 (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Está presente nas cavidades orofaríngea e nasal, nas mãos, unhas, cabelos, pelos, além da pele e pode ser facilmente veiculado aos alimentos causando surtos de DVA se não forem adotadas práticas adequadas de higiene (WERTHEIM et al., 2005). O período de incubação e a sintomatologia deste patógeno variam com a sensibilidade do indivíduo e a quantidade de toxina no alimento ingerido (FRANCO; LANDGRAF, 2005). Os principais sintomas são náuseas, vômito, câibras abdominais e diarreia. O período de incubação varia de 15 minutos a 8 horas, sendo em média 2 a 4 horas (LOIR et al., 2003)

Os manipuladores de alimento estão associados a 24% de todos os casos de enfermidades veiculadas por alimentos em países desenvolvidos, destacando-se dentre as bactérias envolvidas *S. aureus* (ARIAS-ECHANDI, 2000).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2013, no Brasil, *S. aureus* foi o segundo microrganismo mais relacionado a casos de surtos registrados entre os anos de 2000 e 2015. Sendo responsável por 7,6% dos casos registrados, estando atrás somente da *Salmonella* spp., com 14,3% casos registrados. *Escherichia coli* ocupa o quarto lugar, com 6,4% casos (BRASIL, 2016).

O pescado pode estar contaminado com *S. aureus* provenientes de manipuladores infectados ou do ambiente. A intoxicação alimentar provocada por este microrganismo é devido à ingestão de enterotoxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento e representando um risco para saúde pública. Os diferentes tipos de enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus* sp. foram inicialmente descritas sendo 5 tipos sorologicamente

distintos, denominados de SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED e SEE. Na sequência, novas enterotoxinas foram descritas e denominadas SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU (JORGENSEN et al., 2005). A enterotoxina estafilocócica é termoestável e está presente no alimento mesmo após o cozimento, possibilitando desta forma, a instalação de um quadro de intoxicação de origem alimentar (NETO; SILVA; STAMFORD, 2002).

4.4. *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria do grupo dos coliformes termotolerantes, pertencente à família Enterobacteriaceae e a principal causadora de doenças diarreicas via ingestão de água e alimentos contaminados. São microrganismos Gram negativos, em forma de bastonetes, não esporulados e móveis, com presença de flagelos peritríquios. Possuem metabolismo respiratório e fermentativo, pois são anaeróbios facultativos, com temperatura ótima de crescimento a 37°C (SCHEUTZ; STROCKBINE, 2005).

É uma espécie predominante entre os diversos microrganismos anaeróbios facultativos que fazem parte da microbiota intestinal de animais endotérmicos. No entanto, são comumente isoladas de alimentos, permitindo-se suspeitar do contato destes com material contaminado por fezes em alguma etapa da sua produção, portanto condições higiênicas insatisfatórias e eventual presença de enteropatógenos (ARAÚJO et al., 2011). Outro aspecto a ser considerado é que diversas estirpes são comprovadamente patogênicas para o homem e animais, dentre essas a *E. coli* O157:H7, implicada como agente etiológico da colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica (FRANCO; LANDGRAF, 2005). O período de incubação das infecções ocasionadas por *E. coli* é de 3 a 4 dias, embora incubações de 5 a 8 dias e 1 a 2 dias já tenham sido descritas. A diarreia é o sintoma inicial, podendo ser precedida de dores abdominais e febre (NASCIMENTO; STAMFORD, 2000; NATARO; KAPER, 1998).

Existem três síndromes clínicas causadas por infecções de cepas de *E. coli*: infecções do trato urinário; meningite e septicemias; e gastroenterites (NATARO; KAPER, 1998). De acordo com sua virulência, as cepas de *E. coli* responsáveis pelas gastroenterites são classificadas como *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E.*

coli enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente (DAEC) (MURRAY, 2009).

Escherichia coli não é um habitante natural da microbiota de peixes, porém tem sido isolada com frequência no intestino desses animais, pois ambientes aquáticos contaminados podem transmitir o patógeno (GUZMÁN et al., 2004). Barbosa et al. (2014) analisando água e peixes de pesque pagues da Microbacia de Córrego Rico, Jaboticabal (SP) no Brasil, encontraram 115 estirpes de *E. coli*, entre as quais foram encontrados diversos sorogrupos como EPEC (*E. coli* enteropatogênica) e a EIEC (*E. coli* enteroinvasiva).

4.5. *Pseudomonas aeruginosa*

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é considerada um bacilo Gram negativo, aeróbico, não formador de esporos, pertencente à família Pseudomonadaceae. Esse bacilo apresenta-se sozinho, em pares ou em pequenas cadeias, sendo móvel devido à presença de um ou mais flagelos polares (FUENTEFRÍA et al., 2008). Por ser um agente patogênico oportunista, pode ocasionar infecções quando há redução dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Além disso, apresenta resistência a uma ampla variedade de condições físicas, incluindo capacidade de se multiplicar sob refrigeração, com elevadas concentrações de corantes e sais, propriedades que contribuem para sua presença em diversos ambientes (PIRNAY et al., 2005).

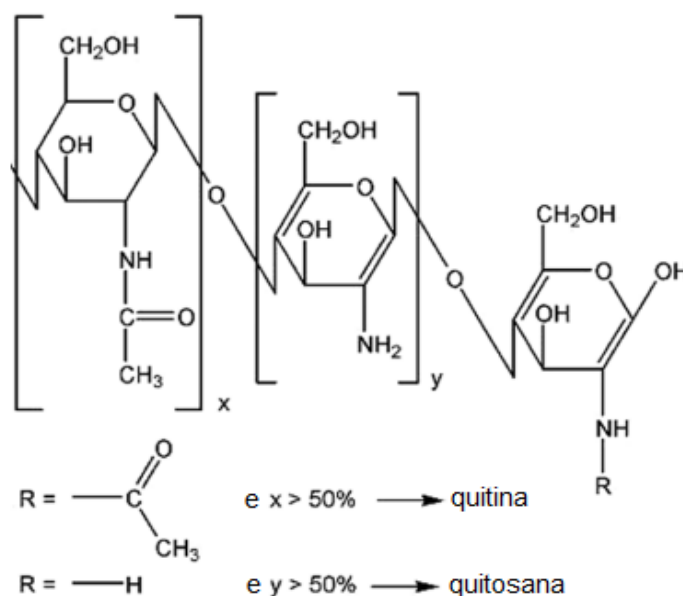
Possui intensa atividade metabólica, degradando proteínas, gorduras, carboidratos e outros substratos, além de produzir pigmentos que causam alterações nas características químicas e sensoriais do alimento. Sua presença em níveis elevados, no final do processamento, resulta na redução da vida de prateleira de produtos refrigerados, devido à produção do muco superficial, além de odores e sabores desagradáveis, sendo, portanto, seu estudo de grande importância para a indústria de alimentos (GUAHYBA, 2003).

5. Antimicrobianos naturais

5.1. Quitosana

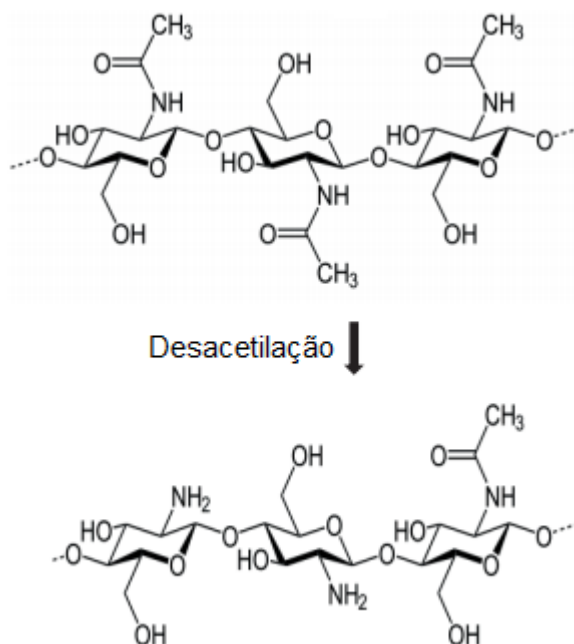
A quitosana é um amino polissacarídeo, derivado da desacetilação do grupo N-acetil da quitina, a qual constitui a maior parte dos exoesqueletos dos insetos, crustáceos e parede celular dos fungos. É considerada um dos compostos orgânicos mais abundante e importante da natureza (AZEVEDO et al., 2007). É um heteropolímero policatiônico composto por ligação β (1 \rightarrow 4) de N-acetil-Dglucosamina e D-glucosamina (Figura 4), originado a partir da reação de desacetilação parcial de quitina (Figura 5), geralmente por tratamento alcalino. É insolúvel em soluções aquosas com pH superior a 7, porém, em ácidos, os grupos amino livres são protonados e a molécula torna-se altamente solúvel em pH ácido (KRAJEWSKA, 2004; CHEN et al., 2005).

Figura 4. Estrutura química da quitina e da quitosana.



Fonte: (ZARGAR; ASGHARI; DASHTI, 2015).

Figura 5. Reação de desacetilação da quitina, originando a quitosana.



Fonte: (ZARGAR; ASGHARI; DASHTI, 2015).

Por ser um produto natural, de baixo custo, renovável, abundante e atóxico, a quitosana tem despertado grande interesse econômico e tecnológico (SANTOS et al., 2003). Tem sido proposta como um material potencialmente atraente para diversos usos, como na área alimentícia e biotecnológica, ciência dos materiais, tratamento de água, drogas e produtos farmacêuticos, agricultura, proteção ambiental, incluindo a propriedade de não ter quase nenhuma toxicidade ao homem (AZEVEDO et al., 2007; RAMOS BERGER et al., 2011).

Entre os vários agentes antimicrobianos naturais, a quitosana vem sendo utilizada para aplicações comerciais em alimentos por ser um produto de origem natural, possuir propriedade antimicrobiana e antioxidante, de biodegradabilidade, biocompatibilidade, capacidade de formação de filmes, e por ser classificado como um produto GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo *Food and Drug Administration* dos EUA em 2001 (SAGOO; BOARD; ROLLER, 2002; DEVLIEGHRE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004).

A propriedade antimicrobiana da quitosana mostra-se eficaz na inibição tanto de bactérias Gram positivas quanto Gram negativas, como também de leveduras e bolores, e por isso, tem sido bastante utilizada em alimentos como filmes e revestimentos antimicrobianos (SIRIPATRAWAN; HARTE, 2010). Com esta propriedade, esse composto tem a capacidade de prolongar a vida útil do produto, com sua qualidade e segurança também melhores preservadas (SUPPAKUL et al., 2003; KUORWEL et al., 2013).

Os biofilmes e revestimentos edíveis de quitosana estão a ganhar cada vez mais importância, uma vez que dão resposta a vários desafios relacionados com o armazenamento de produtos alimentares e surgem como uma alternativa para reduzir os efeitos prejudiciais impostos pelo processamento dos alimentos, aumentando o tempo de prateleira (PINHEIRO et al., 2010).

O revestimento por meio do método de imersão é o método geralmente usado para revestir frutos, queijos, vegetais, carnes e peixes. Neste método, o produto é diretamente imerso na formulação do revestimento em meio aquoso, o excesso é removido e o revestimento é seco, formando-se um filme sobre a superfície do produto (PINHEIRO et al., 2010).

Diversos autores relataram o efeito conservante da aplicação de revestimentos ou biofilmes de quitosana por meio da inibição antimicrobiana e antioxidante em alimentos. Fernández-Saiz et al. (2013) avaliaram o efeito de biofilmes de quitosana na extensão da vida útil de filés frescos de peixes em armazenamento refrigerado durante 15 dias, observando um aumento significativo da fase de latência e uma redução da população microbiana final das bactérias aeróbias mesófilas, bactérias produtoras de H₂S e *Pseudomonas* sp.

Wang et al. (2015) observaram que o revestimento antimicrobiano de quitosana em carnes assadas contaminadas intencionalmente com *L. monocytogenes* reduziu as populações em cerca de 0,9 a 0,3 log UFC/cm². Segundo o autor, quanto mais elevada for a concentração da solução antimicrobiana de revestimento, melhor o efeito antilisterial.

Shekarforoush et al. (2015) avaliaram o efeito antimicrobiano do revestimento de quitosana em carnes de frango pronto para churrasco sobre *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7, evidenciando que a

quitosana individualmente não mostrou efeito inibitório sobre *E. coli* O157:H7, porém foi eficaz contra *L. monocytogenes*.

Apesar de comprovada a atividade antimicrobiana e antioxidante do revestimento de quitosana por diversos autores, Aider (2010) relatou que em matrizes alimentares complexas, a quitosana pode diminuir o seu efeito antimicrobiano. Esse fator está diretamente relacionado a seu caráter catiônico, onde o composto tem o potencial de se ligar a diferentes componentes do alimento, tais como alginatos, pectinas, proteínas, polieletrólitos inorgânicos, tais como polifosfato e espécies de íons carregados positivamente.

Uma vez que as propriedades antimicrobianas da quitosana dependem significativamente dos nutrientes do alimento, a eficácia na matriz alimentar deve ser verificada especificamente para cada produto (FERNÁNDEZ-SAIZ et al., 2010).

5.2. Óleos essenciais

A busca por compostos antimicrobianos naturais tem se intensificado com o propósito de serem aplicados na conservação de alimentos (BURT, 2004). Os óleos essenciais extraídos de plantas têm sido considerados uma fonte segura de antimicrobianos naturais, por não apresentarem riscos à saúde dos consumidores (TRAJANO et al., 2009).

Os óleos essenciais (OE) estão presentes nas plantas como um produto natural e são definidos como parte do metabolismo vegetal, composto geralmente por terpenos que estão associados ou não a outros componentes, cuja maioria, são voláteis e geram o odor do vegetal (BANDONI; CZEPAK, 2008). Estes compostos são constituídos, por hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos como enxofre (SIMÕES et al., 2001).

Os OE são obtidos a partir de materiais vegetais como flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutos e raízes. Podem ser obtidos pela fermentação ou extração, mas o método de arraste a vapor é o mais comumente usado para fins comerciais (ARIDOGAM et al., 2002).

As atividades biológicas antimicrobianas dos óleos essenciais estão diretamente correlacionadas com a presença fitoconstituintes com propriedades biológicas ativas (POZZATTI et al., 2009). Diversos estudos tem reportado o efeito inibitório dos óleos essenciais sobre diferentes microrganismos contaminantes de alimentos.

Araújo et al. (2015) ao verificarem a suscetibilidade antimicrobiana do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) relataram a sensibilidade à ação do óleo essencial dos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis*, sendo observada uma maior ação do óleo sobre bactérias Gram positivas.

Silva et al. (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de tomilho, cravo da índia e alecrim e dos conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, os autores relataram que os óleos essenciais avaliados apresentaram melhor resultado quando comparado aos conservantes sintéticos, com valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) inferiores a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, valor este apresentado para os conservantes sintéticos. Segundo Menezes et al. (2009), os produtos naturais apresentam atividade antimicrobiana adequada quando sua concentração inibitória é inferior a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Apesar de comprovada por diversos autores o potencial e efeito antimicrobiano de diversos OE contra uma vasta gama de microrganismos ao longo dos anos, o mecanismo de ação dos OE ainda não está completamente elucidado (BURT, 2004).

Os óleos essenciais de plantas condimentares são bastante conhecidos por suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes. O cravo da índia é uma planta condimentar frequentemente utilizada na culinária, normalmente usado o botão foral, com a finalidade principal de conferir sabor e aroma aos alimentos (LORENZI; MATOS, 2002).

O óleo essencial extraído dos botões florais do cravo da índia tem sido relatado por suas propriedades antimicrobianas sobre fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de vírus e protozoários (AFONSO et al., 2012). Pesquisas comprovam os efeitos antimicrobianos do óleo essencial de cravo

sobre diversos patógenos, como *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium perfringens* (SCHERER et al., 2009). No entanto, estudos relatam sua ineficácia contra a *Pseudomonas aeruginosa* (SCHERER et al., 2009). De acordo com Oliveira (2009b) essa atividade antimicrobiana pode variar de acordo com os teores dos componentes químicos majoritários presentes nesse óleo, principalmente o eugenol.

Em estudos descritos por Silvestri et al. (2010) demonstraram atividade antibacteriana do óleo essencial de cravo usando-se valores de 5, 10 e 15µL, frente a 18 microrganismos. Segundo o autor, o óleo essencial de cravo mostrou valores de CIM de 200 µg.mL⁻¹ a 600 µg.mL⁻¹, apresentado melhor inibição contra as bactérias Gram positivas.

Valores inferiores foram encontrados por Mith et al. (2014) ao analisarem a atividade antimicrobiana de 15 óleos essenciais comerciais, verificando valores de CIM do óleo essencial de cravo menores que 1 µL.mL⁻¹ para *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 e *Pseudomonas fluorescens*.

De acordo Bozin et al. (2006), a variação de valores apresentados entre diferentes autores pode ser explicada pela diferença na composição dos óleos essenciais e pela porcentagem de constituintes e substâncias ativas. Além disso, outros fatores podem influenciar na variação da composição como: espécies, subespécies, variedade de plantas, localização geográfica, estação de colheita e também os métodos de secagem (SARAC; URGUR, 2008).

Almeida et al. (2014) avaliaram o potencial antimicrobiano do óleo essencial de cravo na concentração de 400µL.g⁻¹ em carne moída de ovinos contaminada intencionalmente com *S. aureus*. De acordo com os autores o óleo essencial de cravo apresentou redução significativa do *S. aureus*, com populações de 4,77, 4,73, 4,61 e 1,96 log de UFC.g⁻¹, nos tempos 0, 5, 15 e 60 minutos, respectivamente, sugerindo que o aumento do tempo de exposição do óleo ao microrganismo potencializou o efeito antimicrobiano.

Wu et al. (2017) ao avaliarem a aplicação de filmes de gelatina incorporados com óleos essenciais na conservação de peixes e produtos do mar verificaram

que os mesmos apresentaram efeitos inibitórios contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Aspergillus niger* em peixes, podendo ser utilizados para o desenvolvimento de embalagens ativas.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. G. et al. Caracterização sensorial e análise bacteriológica do peixe-sapo (*Lophius gastrophysus*) refrigerado e irradiado. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 498-503, 2008.

ABREU, D. A. P. et al. Evaluation of the effectiveness of a new active packaging film containing natural antioxidants (from barley husks) that retard lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Food Research International**, Essex, v. 43, n. 5, p. 1277-1282, 2010.

AFONSO, R. S. et al. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da índia. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 4, n. 2, p. 146-161, 2012.

AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. **Food Science and Technology**, London, v. 43, n. 6, p. 837-842, 2010.

ALMEIDA, A. C. et al. Potencial antimicrobiano dos óleos essenciais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) e alfavacão (*Ocimum gratissimum* L.) em carne moída de ovinos contaminada experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 20, n. 4, p. 248-251, 2014.

ARAÚJO, A. J. G. et al. Qualidade microbiológica do caranguejo-uçá exposto à venda em três pontos na orla da Praia do Futuro, Fortaleza - CE - Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 409-416, 2011.

ARAÚJO, L. S. et al. Composição química e susceptibilidade do óleo essencial de óregano (*Origanum vulgare* L., família Lamiaceae) frente à cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 33, n. 1, p. 73-78, 2015.

ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. **Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. Brasília: CNPq. 186p.

ARIAS-ECHANDI, M. L. Contaminación microbiológica de los alimentos en Costa Rica. Una revisión de 10 años. **Revista Biomédica**, Yucatan, v.11, n. 2, p.113-122, 2000.

ARIDOGAN, B. C. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. **Archives Pharmacal Research**, Seoul, v. 25, n. 6, p. 860-864, 2002.

ARKOUDELOS, J.; STAMATIS, N.; SAMARAS, F. Quality attributes of farmed eel (*Anguilla anguilla*) stored under atmosphere, vacuum and modified atmosphere packaging at. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 7-8, p. 728-735, 2007.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.

BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores**. Vitória: EDUFS, 2008. 623p.

BARBOSA, M. M. C. et al. Serology and patterns of antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli* isolates from pay-to-fish ponds. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 1, p. 43-48, 2014.

BEIRÃO, L. H. et al. **Tecnologia pós-captura de pescado e derivados**. In: Polli, CR et al. Aquicultura: experiências brasileiras. Florianópolis: UESC; 2004. p. 407-42.

BERTSCH, D. et al. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 63, n. 2, p. 526–532, 2013.

BHOWMICK, P. P. et al. Presence of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes in seafood-associated *Salmonella* serovars and the role of the sseC gene in survival of *Salmonella enterica* serovar Weltevreden in epithelial cells. **Microbiology**, Barcelona, v.157, n. 1, p.160-168, 2011.

BONILLA, J. et al. Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. **Journal of Food Engineering**, London, v. 110, n. 2, p. 208-213, 2012.

BOZIN, B. et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the

entire oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 5, p. 1822–1828, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 7 jul. 1952.

BRASIL. Ministério da saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico Sobre Os Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10/01/2011, seção I, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. **Resolução – RDC nº 216 de 15 de set. de 2004**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/bps.htm>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 158 p. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2016.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico de pesca e aquicultura do Brasil 2011**. Brasília: República Federativa do Brasil, 2013. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est_2011_bol__bra.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2017.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Plano de desenvolvimento da aquicultura brasileira - 2015/2020**. 2015a. Disponível em: <http://seafoodbrasil.com.br/wpcontent/uploads/2015/09/Plano_de_Desenvolvimento_da_Aquicultura-2015-2020.pdf>. Acesso em: 24 mai. 2017.

BRASIL. Secretária de Vigilância Sanitária. **Doença transmitida por alimento**. 2015b. Disponível em: <<http://www.vigilanciasanitaria.sc.gov.br/index.php/inspecao-de-produtos-e-servicos-de-saude/alimentos/91-area-de-atuacao/inspecao-de-produtos-e->

servicos-de-saude/alimentos/415-doenca-transmitida-por-alimento-dta.>. Acesso em: 20 mai. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos Alimentares no Brasil – Dados atualizados em 2015**. 2015c. Disponível em: <<http://foodsafetybrazil.org/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-2015/>>. Acesso em: 19 fev. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos Alimentares no Brasil – Dados Atualizados em Janeiro de 2016**. Disponível em: <<http://foodsafetybrazil.org/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-janeiro-de-2016/#ixzz4hxYDAH8Q>>. Acesso em: 22 mai. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos Alimentares no Brasil – Dados atualizados em Maio de 2017**. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2018.

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

CAETANO, A. C. S. **Potencial antioxidante de extratos de resíduos de acerolas (*Malpighia emarginata* D. C.) em diferentes sistemas modelos e na estabilidade oxidativa de óleo de soja**. 2009. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

CAMEJO, A. et al. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 379-394, 2011.

CHAHAD, O. B. et al. Discovery of novel biopreservation agents with inhibitory effects on growth of food-borne pathogens and their application to seafood products. **Research in Microbiology**, Paris, v. 163, n. 1, p. 44-54, 2012.

CHEN J, L. I. et al. Study on biocompatibility of complexes of collagen chitosan-sodium hyaluronate and cornea. **Artificial Organs**, Cleveland, v. 29, n. 13, p. 104, 2005.

CONNOR, B. A.; SCHWARTZ, E. Typhoid and paratyphoid fever in travellers. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 5, n. 10, p. 623-628, 2005.

COSTA, R. A. **Pesquisa de *Vibrio* no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no estado do Ceará**. 2006. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 703-714, 2004.

DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. Washington: ASM Press., 2007. 116p.

DUTRA-DE-OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 2010. 156p.

FAO – Food and Agriculture Organization of The United Nations. **Fisheries and Aquaculture topics. Composition of fish. Topics Fact Sheets**. 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/topic/12318/en>>. Acesso em: 4 fev. 2016.

FAO – Food and Agriculture Organization of The United Nations. **Farming the waters for people and food**. Proceedings of the Global Conference on Aquaculture. 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/015/i2734e/i2734e00.htm>>. Acesso em: 20 fev. 2016.

FAO – Food and Agriculture Organization of The United Nations. **Food outlook: biannual report on global food markets**. Rome: FAO, 2013. 134p.

FAO – Food and Agriculture Organization of The United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture**, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

FAO – Food and Agriculture Organization of The United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture**, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>>. Acesso em: 14 jun. 2017.

FERNÁNDEZ-SAIZ, P. et al. Chitosan films for the microbiological preservation of refrigerated sole and hake fillets. **Food Control**, Vurrey, v. 34, n. 1, p. 61-68, 2013.

FOGAÇA, F. H. S. et al. Oxidação lipídica em filés de tambaqui (*Colossoma macropomum*) defumados com alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **PUBVET**, Londrina, v. 8, n. 10, p. 171-7, 2014.

FRANCO, B. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu. 2005. 182p.

FUENTEFRIA, D. B. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 470-473, 2008.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 1-15, 2007.

GASPAR, J.; VIEIRA, R.; TAPIA, M. Aspectos sanitários do pescado de origem de água doce e marinha, comercializado na feira de Gentilândia, Fortaleza, Ceará. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 11, n. 51, p. 20-23, 1997.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Manole, 2008. 986p.

GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: Ateneu, 2011. 608p.

GREIG, J. D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 130, n. 2, p. 77-87, 2009.

GUAHYBA, A. S. **Microrganismos Deteriorantes**. Centro Universitário - UNIVATES, Lajedo, RS. 2003 (Apostila Técnico em Química).

GUDMUNDSDOTTIR, S. et al. Contamination of cooked peeled shrimp (*Pandalus borealis*) by *Listeria monocytogenes* during processing at two processing plants. **Food Protection**, Des Moines, v. 69, n. 11, p. 1304, 2006.

GUERIN, P. J.; VOLD, L. A. A.; VILTSLAND, P. Communicable disease control in a migrant seasonal workers population: a case study in Norway. **Euro Surveillance**, Saint Maurice, v. 10, n. 1-3, p. 48-50, 2005.

GUNSTONE, F. D. **Oils and fats in food industry: food industry briefing series**. Wiley-Blackwell, 2008.

GUZMÁN, M. C. et al. Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. **Water Research**, Oxford, v. 38, n. 9, p. 2368-2374, 2004.

HOSSEINI, S. F., REZAEI, M., ZANDI, M., GHAVI, F. F. Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. **Food Chemistry**, Barking, v. 136, n. 3-4, p. 1490-1495, 2013.

HUSS, H. H. **Garantia da qualidade dos produtos da pesca**. FAO – Documento Técnico sobre as Pescas nº 334. Roma, Itália, FAO, 1997. 176p.

IBGE - Instituto Brasileira de Geografia e Estatística. Produção da pecuária municipal 2013. Rio de Janeiro, v. 41, p. 1-108, 2013.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 9, n. 6, p. 341–390, 1990.

JAWETZ, M.; ADELBERG, E. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

JORGENSEN, H. J.; MORK, T.; HOGASEN, H. R.; RORVIK, L. M. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, n. 1, p.158-166, 2005.

KETO-TIMONEN, R. **Amplified fragment length polymorphism analysis in strain typing and identification of *Listeria* and *Clostridium* species**. 2008. 92f. Dissertação (Faculty of Veterinary Medicine) – University of Helsinki, Finland, 2008.

KRAJEWSKA, B. Applications of chitosan and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 35, p.126-139, 2004.

KUORWEL, K. K. et al. Migration of antimicrobial agents from starch-based films into a food simulant. **Food Science and Technology**, London, v. 50, n. 2, p. 432-438, 2013.

LANG, H. E.; NEUHAUS, K. E.; SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 63, n. 2, p. 641–647, 2013.

LEITÃO, M. F. F. et al. Alterações químicas e microbiológicas em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) armazenado sob refrigeração a 5 °C. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 160-166, 1997.

LOIR, Y. L. E.; BARON, F.; GAUTIR, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetic Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA: São Paulo, 2002.

LOURENÇO, M. C. S.; REIS, E. F. M.; VALLS, R. *Salmonella entérica* subsp houtenae sorogrupo O:16 em um paciente HIV positivo: relato de caso. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 169-170, 2004.

MENEZES, T. O. A. et al. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v. 38, n. 3, p.184-191, 2009.

MITH, H. et al. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. **Food Science & Nutrition**, London, v. 2, n. 4, p. 403-416, 2014.

MURRAY, P. R. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 888p.

NASCIMENTO, M. R.; STAMFORD, T. L. M. Incidência de *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 70, p. 32-35, 2000.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NETO, A. C.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, 263-271, 2002.

NORHANA, M. N. W. et al. Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: a review. **Food Control**, Vurrey, v. 21, p. 343-361, 2010.

OCAÑO-HIGUERA, V. M. et al.. Postmortem changes in cazon fish muscle stored on ice. **Food Chemistry**, Barking, v. 116, n. 4, p. 933-938, 2009.

OLIVEIRA, R. A. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 771-775, 2009b.

OLIVEIRA, R. C. O panorama da aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 71-89, 2009a.

OLIVEIRA, A. B. A. et al. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA**, Porto Alegre, v. 30, n. 3, p. 279-285, 2010.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos de origem animal**. São Paulo: Artmed; 2005. 280p.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**, 2008. Disponível em: <<http://projetopacu.com.br/public/paginas/202-livro-aquicultura-no-brasil-o-desafio-e-crescer.pdf>>. Acesso em: 19 jan. 2016.

PAGADALA, S. et al. Comparison of automated BAX PCR and standard culture methods for detection of *Listeria monocytogenes* in blue crabmeat (*Callinectes sapidus*) and blue crab processing plants. **Food Protection**, Des Moines, v. 74, n. 11, p. 1930–1933, 2011.

PANTAZI, D. et al. Shelf-life of chilled fresh mediterranean swordfish (*Xiphias gladius*) stored under various packaging conditions: microbiological, biochemical and sensory attributes. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 1, p. 136-143, 2008.

PINHEIRO, A. C. et al. Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares. **Boletim de Tecnologia**, 2010. Disponível em: <<https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/16725/1/3559.pdf>>. Acesso: 15 dez. 2015.

PIRNAY, J. P. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 7, p. 969-980, 2005.

POZZATTI, P. et al. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. **Mycoses**, Berlin, v. 53, n. 1, p. 5-12, 2009.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes usados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMOS BERGER, L. R. et al. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 12, n. 4, p. 195-215, 2011.

RIBEIRO, A. L. M. S. et al.. Avaliação microbiológica da qualidade do pescado processado, importado no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 16, n. 3, p. 109-112, 2009.

RUFF, N. et al. Slaughtering method and dietary tocopherol acetate supplementation affect rigor mortis and fillet shelf-life of turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture Research**, v. 33, n. 9, p.703, 2002.

ROCHA, C. M. C. et al. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 8, p. 9-11, 2013.

SAGOO, S.; BOARD, R.; ROLLER, S. Chitosan inhibits growth of spoilage microorganisms in chilled pork products. **Food Microbiology**, London, v. 19, n. 2, p. 175-182, 2002.

SANTOS, J. E. et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Paulo, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SANTOS, F. M. S. **Utilização de quitosana no revestimento de filés de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) e na preparação de filmes incorporados com**

óleos essenciais. 2014. 149f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Fisiologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

SARAC, N.; UGUR, A. Antimicrobial activities of the essential oils of *Origanum onites* L., *Origanum vulgare* L. subspecies *hirtum* (Link) Letswaart, *Satureja thymbra* L., and *Thymus cilicicus* Boiss. & Bal. growing wild in Turkey. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 11, n. 3, p. 568-573, 2008.

SARTORI A. G. O; AMANCIO, R. D. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 83-93, 2012.

SCHERER, H. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SCHEUTZ, F.; STROCKBINE, N. A. Genus I. *Escherichia*. The Proteobacteria, Part B: The Gamma proteobacteria. New York: Springer, 2005. 625p.

SCHENATO, M. T. **Coberturas comestíveis a base de quitosana, cálcio e ácidos graxos na qualidade pós colheita de morangos.** 2010. 59f. Monografia (Tecnologia de alimentos) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Rio grande do Sul, 2010.

SHEKARFOROUSH, S. S. et al. Effect of chitosan on spoilage bacteria, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in cured chicken meat. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 76, n. 9, p. 303-309, 2015.

SHINOHARA, N. K. S. et al. *Salmonella* spp. importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.

SIDONIO, L. et al. **Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades.** BNDES Setorial, v. 35, p. 421-463, 2012.

SILVA, A. A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (tomilho), *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e dos conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 33, n. 1, p.111-117, 2015.

SILVESTRI, J. D. F. et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, n. 5, p. 589-594, 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS. 2001. 1104p.

SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B. R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 8, p. 770-775, 2010.

SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 1-10, 2012.

SONG, Y. et al. Effect of sodium alginate-based edible coating containing different anti-oxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*Megalobrama amblycephala*). **Food Control**, Vurrey, v. 22, n. 3-4, p. 608-615, 2011.

SPIN-NETO, R. et al. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, Arararquara, v.37, n. 2, p. 61-155, 2008.

SUPPAKUL, P. et al. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 68, n. 2, p. 408-420, 2003.

TESSARI, E. N. C. et al. **Important Aspects of Salmonella in the Poultry Industry and in Public Health**. In: MAHMOUD, B. S. M. *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen*. Croatia: Intech, 2012. p. 181-199.

TOLEDO, M. C. F.; ESTEVES, W.; HARTMANN, E. M. Eficiência de antioxidantes em óleo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 5, n. 1, p. 1-11, 1985.

TRAJANO, V. N., et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.

VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. **Fishes of the Amazon and their environment: Physiological and Biochemistry Features**. Berlin: Springer Verlag. 224p.

VÁSCONEZ, M. B. et al. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. **Food Research International**, Essex, v. 42, n. 7, p. 762-769, 2009.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 3, p. 584-640, 2001.

VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda., 2004. 380 p.

WANG, L. et al. Application of a novel antimicrobial coating on roast beef for inactivation and inhibition of *Listeria monocytogenes* during storage. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 211, p. 66-72, 2015.

WERTHEIM, H. F. et al. the role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infectious Diseases*, New York, v. 5, n. 12, p. 751-762, 2005.

WU, J. et al. Propriedades físico-químicas, atividade antimicrobiana e liberação de óleo de filmes de gelatina de peixe incorporados com óleo essencial de canela. **Aquiculture and Fisheries**, p. 1-8, 2017.

ZAMBOM, M. A.; SANTOS, G. T.; MODESTO, E. C. Importância das gorduras poli-insaturadas da saúde humana. **Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 7, p. 547-553, 2004.

ZARGAR, V; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives and applications. **ChemBioEng Reviews**, v. 2, n. 3, 204-226, 2015.

CAPÍTULO 2

Potencial antimicrobiano do revestimento de quitosana associado ao óleo essencial de cravo em filés de tambaqui

Potencial antimicrobiano do revestimento de quitosana associado ao óleo essencial de cravo em filés de tambaqui

Antimicrobial potential of the chitosan coating associated with clove essential oil in tambaqui fillets

Brenda Borges Vieira^a, Elaine Araújo de Carvalho^a, Norma Suely Evangelista-Barreto^a

^aCentro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 44330 000, Bahia, Brasil.

Destaques

- Foi verificado o potencial antimicrobiano da quitosana e do óleo essencial de cravo
- As bactérias Gram positivas são mais sensíveis a quitosana e ao óleo essencial de cravo que as bactérias Gram negativas.
- A atividade antimicrobiana variou para as bactérias Gram positivas e Gram negativas e foi influenciada pelo peso molecular da quitosana.
- O revestimento de quitosana associado ao óleo essencial de cravo reduziu significativamente o número de *L. monocytogenes* e *S. aureus* nos filés de tambaqui.
- O óleo essencial de cravo potencializou o efeito antimicrobiano da quitosana nos filés de tambaqui

Potencial antimicrobiano do revestimento de quitosana associado ao óleo essencial de cravo em filés de tambaqui

Antimicrobial potential of the chitosan coating associated with clove essential oil in tambaqui fillets

Brenda Borges Vieira^a, Elaine Araújo de Carvalho^a, Norma Suely Evangelista-Barreto^{a,*}

^aCentro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 44330 000, Bahia, Brasil.

*Autor para correspondência: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental, Rua Rui Barbosa 710, 44330-000, Cruz das Almas, Bahia. Telefone: +55 075 988479484; e-mail: nsevangalista@yahoo.com.br.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano do revestimento de quitosana associado ao óleo essencial de cravo (OEC) em filés de tambaqui. A taxa de inibição da quitosana foi determinada por meio do teste de difusão em ágar nas concentrações de 0; 0,0625; 0,125; 0,5; 1 e 2%. Foi verificada a atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). O potencial antimicrobiano do revestimento (quitosana 2%, quitosana 2% + OEC 1600 µg.mL⁻¹ e quitosana 0,5% + OEC 800 µg.mL⁻¹), foi verificado com a contaminação intencional dos filés com *Escherichia coli* O157:H7 CDCEDL933, *Listeria monocytogenes* CERELA, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Staphylococcus aureus* ATCC43300 mantidos sob refrigeração a 4°C/72 h. Inibição de 100%, CIM e CBM foi obtida para *L. monocytogenes* a 2% e *S. aureus* a 0,5% de quitosana. Os demais microrganismos não foram inibidos. O OEC apresentou halos de inibição variando de 09,75 a 19,36 mm. *Pseudomonas aeruginosa* apresentou uma CIM de 3200 µg.mL⁻¹, *S. Enteritidis*, *E. coli* e *S. aureus* de 1600 µg.mL⁻¹ e *L. monocytogenes* de 800 µg.mL⁻¹. Não houve CBM para os microrganismos testados, sendo o óleo bacteriostático. O revestimento de quitosana apresentou inibição de todos os patógenos testados nos filés de tambaqui, entretanto, o sinergismo com o OEC potencializou significativamente o efeito do revestimento (p<0,05), sendo mais efetivo na inibição de *L. monocytogenes* e *S. aureus*. O

revestimento de quitosana associado ao OEC apresentou efeito antimicrobiano promissor para o controle de patógenos em filés de tambaqui, sendo mais efetivo contra patógenos Gram positivos.

Palavras-chave: Antimicrobianos naturais, Controle, Patógenos, Revestimentos edíveis.

Abstract

The objective of this work was to evaluate the antimicrobial potential of the chitosan coating associated with clove essential oil (OEC) in tambaqui fillets. The inhibition rate of chitosan was determined by means of the agar diffusion test at concentrations of 0; 0,0625; 0,125; 0,5; 1 and 2%. The antimicrobial activity of clove essential oil, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) was verified. The antimicrobial potential of the coating (chitosan 2%, chitosan 2% + OEC 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and chitosan 0,5% + OEC 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) was verified with the intentional contamination of fillets with *Escherichia coli* O157:H7 CDCEDL933, *Listeria monocytogenes* CERELA, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 and *Staphylococcus aureus* ATCC43300 maintained under refrigeration at 4°C/72h. Inhibition of 100%, CIM and CBM was obtained for *L. monocytogenes* at 2% and *S. aureus* at 0,5% of chitosan. The other microorganisms were not inhibited. The OEC showed inhibition halos varying from 09,75 to 19,36 mm. *Pseudomonas aeruginosa* presented a MIC of 3200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, *S. Enteritidis*, *E. coli* and *S. aureus* of 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and *L. monocytogenes* of 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. There was no CBM for the microorganisms tested, being the bacteriostatic oil. The chitosan coating showed inhibition of all pathogens tested in tambaqui fillets, however, synergism with OEC significantly potentiated the coating effect ($p < 0,05$), being more effective in the inhibition of *L. monocytogenes* and *S. aureus*. The chitosan coatings associated to OEC showed a promising antimicrobial effect for the control of pathogens in tambaqui fillets, being more effective against Gram positive pathogens.

Key words: Natural antimicrobials, Control, Pathogens, Edible coatings.

1. Introdução

Nos últimos anos, o pescado foi a carne mais demandada e de maior valor de mercado no mundo, levando a um maior controle na qualidade e segurança desses alimentos (Sidonio et al., 2012). O pescado representa uma das principais fontes de proteína na alimentação humana, caracterizado por sua elevada digestibilidade e alto valor biológico, proteínas, ácidos

graxos poli-insaturados, vitaminas e minerais, sendo um dos alimentos mais saudáveis do ponto de vista nutritivo (Fao, 2005; Ramos-Filho, 2008).

Embora apresente grande importância nutricional, o pescado é o alimento mais susceptível a deterioração entre os produtos de origem animal (Soares; Gonçalves, 2012). Além disso, em algumas situações, o pescado pode servir como importante via de transmissão de agentes infecciosos como *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus* (Fao, 2010; Santiago, Araújo, Santiago, Carvalho & Vieira, 2013).

Para a garantia da segurança e atendimento à demanda para a conservação de atributos nutricionais e de qualidade em peixes, tem-se intensificado a busca por antimicrobianos naturais com potencial aplicação em alimentos, que possam ser utilizados sozinhos ou em combinação com outras tecnologias. Assim, a escolha de um antimicrobiano deve ser baseada na compatibilidade química e sensorial deste com o alimento, na sua efetividade contra microrganismos indesejáveis e a sua segurança (Settanni & Corsetti, 2008).

A quitosana, um heteropolímero policatiônico composto por ligação β (1 \rightarrow 4) de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina, originado a partir da reação de desacetilação parcial de quitina, vem sendo considerado um biopolímero ideal para aplicações em alimentos por ser um produto natural, de biodegradável e biocompatível. Outras características interessantes são suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, sua capacidade de formação de filmes e revestimentos e por ser classificado como um produto GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos EUA em 2001 (Azevedo, Chaves, Bezerra, Lia Fook & Costa, 2007; Usfda, 2013).

Devido à essas características, a quitosana tornou-se promissora para ser utilizada como filmes e revestimentos edíveis em alimentos, visando melhorar a vida útil do produto, preservar a segurança microbiológica, além de manter inalteradas suas características nutricionais e sensoriais (Iturriaga, Olabarrieta & Marañón, 2012).

A combinação da quitosana com lipídios produz filmes e revestimentos com características otimizadas (Baldwin, Nisperos, Hagenmaier & Baker, 1997). Os óleos essenciais são considerados lipídeos adequados à incorporação nos filmes e revestimentos, uma vez que estes exibem características adicionais como antimicrobiano e antioxidante, potencializando o efeito conservante do revestimento e atribuindo características sensoriais ao pescado (Sivakumar & Bautista-Banos, 2014). Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano do revestimento de quitosana e sua associação com óleo

essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) na redução da carga microbiana de patógenos de interesse alimentar em filés de tambaqui (*Colossoma macropomum*) mantidos sob refrigeração.

2. Material e métodos

2.1. Microrganismos e preparo do inóculo

Os microrganismos utilizados foram: *Escherichia coli* O157:H7 CDCEDL933, *Listeria monocytogenes* CERELA, *Salmonella* Enteritidis ATCC13076, *Staphylococcus aureus* ATCC43300 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. As linhagens são pertencentes ao acervo do Laboratório de Microbiologia Ambiental e de Alimentos (LABMAA).

As estirpes foram estriadas em ágar triptona de soja (Himedia®), incubadas a 37°C por 24 h e padronizado o inóculo em solução de NaCl a 0,85% em espectrofotômetro (Spectrum SP1105) com comprimento de onda de 625 nm e leitura de absorbância no intervalo de 0,08 a 0,10 (10^8 UFC.mL⁻¹), correspondente a 0,5 na escala McFarland.

2.2. Atividade antimicrobiana da quitosana

Foi utilizada a quitosana de alto peso molecular (310 KDa), com grau de desacetilação de 91,5% obtida da POLYMAR Indústria e Comércio LTDA (Fortaleza, Ceará, Brasil).

A suspensão bacteriana padronizada de acordo com o item 2.1. foi diluída com solução de NaCl 0,85% até obtenção do inóculo a 10^3 UFC.mL⁻¹ (Wang & Wang, 2011).

A solução principal de quitosana a 2% foi preparada por dissolução da quitosana (p/v) dissolvida em ácido láctico a 1% e agitada com agitação magnética por 24 horas até se obter uma solução homogênea. Em seguida, diferentes concentrações foram preparadas por diluição seriada, as quais foram esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 µm. Alíquotas de 50 µL da suspensão bacteriana contendo 10^3 UFC.mL⁻¹ foram adicionadas em placas de ágar nutriente (Himedia®) juntamente com 100 µL da solução de quitosana nas concentrações de 0,0625%, 0,125%, 0,25%, 0,5%, 1% e 2%. Ambos foram espalhados uniformemente por meio da técnica de “spread plate”. Além disso, placas com ágar nutriente (Himedia®) foram incubadas apenas com água estéril e solução de ácido láctico a 1% como controle. Todas as amostras foram inoculadas em triplicata e incubadas a 37°C por 24 horas.

A taxa de inibição (TI) foi calculada de acordo com a seguinte equação: $TI (\%) = (N_1 - N_2/N_1) \times 100$, onde, TI é a taxa de inibição em porcentagem, N_1 é o número de colônias sobre

as placas com água estéril e N₂ é o número de colônias após o tratamento com diferentes concentrações de quitosana e da solução de ácido láctico a 1% (Wang & Wang, 2011).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de reduzir 99% das bactérias viáveis (Kuetze et al., 2008) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi definida como a menor concentração capaz de eliminar 99,9% nas bactérias viáveis (Ruparelia et al., 2008).

2.3. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo por difusão em disco

O óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) – OEC, foi obtido comercialmente em frascos âmbar, lacrados, com volume de 10 mL da empresa Terra Flor Aromaterapia© (Alto Paraíso, Goiás, Brasil).

A atividade antimicrobiana do OEC foi testada por meio da técnica de disco difusão em placas de acordo com o protocolo M2-A8 do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (Clsi, 2003), adaptado para produtos naturais.

A suspensão bacteriana preparada de acordo como item 2.1. foi semeada na superfície de placas de ágar Müeller-Hinton (Himedia®). Em seguida, foram aplicados discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro, impregnados com 10 µL do OEC. A leitura foi realizada após 18 a 24 h de incubação a 37°C, por meio da medição dos halos de inibição de crescimento bacteriano em milímetros de diâmetro.

2.4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de cravo

Pesou-se 1 g do óleo essencial de cravo e dilui-se com metanol até atingir a concentração de 640 mg.mL⁻¹ (Solução I). A seguir, realizou-se a diluição 1:100 em caldo Müeller-Hinton (Himedia®), obtendo-se a concentração de 6400 µg.mL⁻¹ (Solução II).

A CIM foi determinada com base no documento M07-A10 do CLSI (Clsi, 2015) e consistiu na distribuição de 100 µL de caldo Müeller-Hinton em poços de uma placa de microtitulação; a seguir, 100 µL da Solução II foram acrescidos ao primeiro poço e, após homogeneização, transferia-se para o segundo e assim sucessivamente, obtendo-se concentrações finais de 3200, 1600, 800, 400, 200, 100, 50, e 25 µg.mL⁻¹. A partir do inóculo padronizado, conforme item 2.1., foi diluída a suspensão 1:100 com caldo Mueller-Hinton, obtendo-se como inóculo 10⁶ UFC.mL⁻¹. Desta suspensão, foram inoculados 10 µL (10⁴ UFC) em cada poço já contendo os óleos essenciais. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h, em condições de aerobiose. A CIM foi definida como a menor concentração do óleo essencial capaz de causar inibição total do crescimento.

Para a leitura do ensaio foi utilizado o método colorimétrico que consistiu na adição de 20 µL da solução aquosa do corante resazurina sódica (Sigma-Aldrich) na concentração de 0,01% (p/v) em todos os poços da placa, reconhecido como um indicador colorimétrico de oxido-redução. Foram realizados os controle com o diluente, antibiótico (cloranfenicol), de esterilidade dos meios e viabilidade das cepas utilizadas.

2.5. Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de cravo

A partir dos poços onde não houve o desenvolvimento de crescimento bacteriano visível retirou-se uma alíquota de 10 µL para semear na superfície do ágar Mueller-Hinton. Após 48 h de incubação a 37°C foi definida a CBM como a menor concentração do OEC capaz de causar a morte das células (Pozzatti et al., 2009). Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.6. Potencial antimicrobiano do revestimento de quitosana e sua associação com o óleo essencial de cravo em filés de tambaqui contaminados intencionalmente

Os tambaquis foram adquiridos comercialmente no município de Amélia Rodrigues – Ba e transportados em recipiente isotérmico até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental (LABMAA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia em Cruz das Almas – BA, onde foram filetados e separados em grupos de acordo com o microrganismo teste (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*) e controle (água estéril). O efeito antimicrobiano do revestimento de quitosana associado ao OEC foi verificado de acordo com Barbosa et al. (2009) com adaptações. Os filés de tambaqui foram submetidos à análise microbiológica para verificar a presença dos patógenos-teste. Os demais filés foram contaminados intencionalmente, com suspensão bacteriana de 10^6 UFC.mL⁻¹ para cada microrganismo indicador. Após 30 minutos, os filés foram submetidos aos seguintes tratamentos: T1 (solução de revestimento de quitosana 2%), T2 (solução de quitosana 2% + OEC 1600 µg.mL⁻¹) e T3 (solução de quitosana 0,5% + OEC 800 µg.mL⁻¹). Os filés foram imersos em 500 mL de cada solução por 10 segundos. O controle foi imerso em água destilada estéril por 10 segundos. Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C por 72 horas. O experimento foi realizado em triplicata. Foram realizadas análises microbiológicas após 24, 48 e 72 horas dos grupos teste e controle para verificar a carga microbiana dos patógenos (Silva et al., 2010).

2.7. Análises estatísticas

Os dados foram compilados no programa LibreOffice 5.1, submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias obtidas avaliadas segundo o teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$).

3. Resultados e discussão

3.1. Atividade antimicrobiana da quitosana

Os resultados do estudo da atividade antimicrobiana da quitosana contra bactérias Gram negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. Enteretidis*) e Gram positivas (*L. monocytogenes* e *S. aureus*) se encontra na Tabela 1.

Tabela 1. Taxa de inibição da quitosana (%) frente a microrganismos patogênicos de interesse alimentar.

Concentração quitosana (p/v)	Taxa de inibição (%)								
	AL	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	CIM	CBM
Microrganismos	1%								
<i>E. coli</i>	52,40	16,09	08,32	19,36	54,70	33,19	58,98	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	05,20	100,0	97,20	96,80	81,30	72,00	58,20	2,00	2,00
<i>P. aeruginosa</i>	60,40	93,87	88,68	86,65	78,09	71,08	81,85	-	-
<i>S. Enteretidis</i>	40,64	76,42	62,65	61,05	54,98	66,80	69,00	-	-
<i>S. aureus</i>	12,56	100,0	100,0	100,0	99,62	98,84	93,27	0,25	0,50

AL: ácido láctico; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima.

A atividade antimicrobiana da quitosana foi comprovada frente *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. Enteretidis* e *S. aureus* (Tabela 1). O mecanismo de ação antimicrobiana da quitosana ainda não está totalmente elucidado, no entanto, sabendo-se que este sofre influência de diversos fatores como as condições ambientais (pH, tipo de microrganismo e nutrientes), substratos químicos presentes no meio, além de condições estruturais como o grau de desacetilação, peso molecular, formas derivadas da quitosana e sua concentração (Hosseinnejad & Jafari, 2016).

As taxas de inibição da quitosana foram variadas entre as bactérias Gram negativas, sendo que as mesmas não sofreram influência com o aumento da concentração de quitosana. Com relação as bactérias gram negativas, a maior taxa de inibição (93,87%) foi obtida para *P. aeruginosa* a 2% de quitosana. *Escherichia coli* apresentou maior resistência a quitosana dentre as bactérias avaliadas, com taxas de inibição inferiores a 58,98% e elevada interferência do ácido láctico a 1% (52,40%) (Tabela 1).

Escherichia coli O157:H7 é considerada um dos sorovares mais ácido resistentes (Mittelstaedt & Carvalho, 2006). No entanto, no presente trabalho a exposição ao ácido láctico na concentração de 1% apresentou inibição significativa do patógeno (Tabela 1). A inibição é atribuída a utilização do ácido láctico (ácido orgânico fraco), que se apresenta na forma dissociada e não dissociada. A forma não dissociada do ácido é livremente permeável a membrana da célula, se acumulando e, conseqüentemente, promovendo o rompimento da membrana celular e inibição das reações metabólicas essenciais (Bracey, Holyoak & Coote, 1998; Jay, 2005). Tal sensibilidade apresentada ao ácido láctico não foi apresentada à solução de quitosana. A resistência apresentada por *E. coli* O157:H7 a quitosana tem sido relacionada aos diversos mecanismos genéticos para o desenvolvimento de resistência pelo patógeno. Outro fator relacionado à resistência apresentada por *E. coli* O157:H7 são os fatores de virulência. Tanto a virulência quanto a resistência são mecanismos adaptativos selecionados para possibilitar a sobrevivência do microrganismo (Khachatryan, Hancock, Besser & Call, 2005).

A atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram positivas aumentou com o aumento da concentração da quitosana, com *L. monocytogenes* sendo totalmente inibida na concentração de 2% e *S. aureus* na concentração de 0,5% (Tabela 1). A CIM e CBM da quitosana só foi encontrada para *L. monocytogenes* (2%) e *S. aureus* (0,25% e 0,5%, respectivamente) (Tabela 1).

O maior efeito inibitório da quitosana em função do aumento da concentração apresentado sobre *L. monocytogenes* e *S. aureus* é atribuído a maior quantidade de cargas positivas presentes na molécula de quitosana à medida que aumenta sua concentração. Os grupos amínicos protonados (NH_3^+) se ligam seletivamente a membrana celular dos microrganismos carregada negativamente, alterando a atividade celular e a permeabilidade da membrana, conseqüentemente, resultando na inibição microbiana (Yadav & Bhise, 2004; Feng & Xia, 2011; Cai et al., 2015). Tal comportamento também foi observado por Wang e Wang (2011) ao analisarem a atividade antimicrobiana da quitosana e seus derivados, onde a inibição de *S. aureus* aumentou em decorrência do aumento da concentração da quitosana.

3.2. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo

Os valores das médias dos halos de inibição, CIM e CBM do óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) se encontram dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo por disco difusão e diluição em caldo frente a microrganismos patogênicos de interesse alimentar.

Microrganismos	Atividade antimicrobiana					
	Disco difusão (mm)		Diluição em caldo ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	Halos de inibição	CLO	CIM	CBM	CLO	Metanol
<i>E. coli</i>	15,08 \pm 0,41 ^c	30,38	1600	-	60	NI
<i>L. monocytogenes</i>	19,36 \pm 0,63 ^a	26,03	800	-	30	NI
<i>P. aeruginosa</i>	09,75 \pm 0,52 ^d	21,09	3200	-	120	NI
<i>S. Enteretidis</i>	15,51 \pm 1,57 ^c	28,53	1600	-	30	NI
<i>S. aureus</i>	17,19 \pm 0,42 ^b	31,51	1600	-	60	NI

Área de inibição expressa com a média de três repetições \pm desvio padrão. Graus de inibição: < 13,9 mm: fraco; 14 - 18 mm: moderado; >18 mm: forte (Silveira et al., 2012). NI: não houve inibição, CLO: cloranfenicol., CIM: Concentração Inibitória Mínima, CBM: Concentração Bactericida Mínima. Elevada atividade: 50 – 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; moderada atividade: 500 – 1.500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; fraca atividade: > 1500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Sartoratto et al., 2004). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O OEC apresentou efeito inibitório frente às bactérias testadas, sendo que as bactérias Gram positivas apresentaram maior sensibilidade. Foi evidenciado fraco grau de inibição (9,75 mm) frente a *P. aeruginosa* e moderado grau de inibição frente *S. Enteretidis* (15,51 mm), *E. coli* (15,08 mm) e *S. aureus* (17,19 mm). A maior atividade do OEC foi observada sobre a bactéria *L. monocytogenes* com formação de halo de 19,36 mm (forte grau de inibição). Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os halos de inibição das diferentes bactérias após tratamento estatístico dos dados (Tabela 2).

A CIM em relação a *P. aeruginosa* foi de 3200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto *S. Enteretidis*, *E. coli* e *S. aureus* de 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com o OEC sendo um composto de baixa ação antimicrobiana frente a estas bactérias. No entanto, o OEC apresentou moderada atividade antimicrobiana frente *L. monocytogenes* com CIM de 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O OEC não apresentou CBM para os microrganismos testados, sendo este bacteriostático na concentração de até 3200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A maior sensibilidade apresentada por *L. monocytogenes* e *S. aureus* ao OEC (Tabela 2) está relacionada a estrutura simples da parede celular, em contraste com a complexidade apresentada por *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. Enteretidis* que são bactérias ricas em polissacarídeos, que inibem a penetração de substâncias antimicrobianas (Burt, 2004). Apesar de diversos estudos demonstrarem a atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente aos

microrganismos patogênicos e deteriorantes de origem alimentar, semelhante ao observado para quitosana, seu mecanismo de ação ainda não é completamente compreendido (Sartoratto et al., 2004; Silveira et al., 2012; Calo, Crandall, O'Bryan & Ricke, 2015). Dentre os mecanismos propostos para a atividade antimicrobiana se tem a separação da camada lipídica da membrana celular, interrupção de sistemas enzimáticos comprometendo o material genético das bactérias e a formação de hidroperoxidases de ácidos graxos causada pela oxigenação de ácidos graxos não saturados (Atarés & Chiralt, 2016).

A atividade antimicrobiana do OEC tem sido atribuída ao seu constituinte majoritário, o eugenol. O mecanismo primário de ação do eugenol em concentrações bactericidas se deve ao baixo peso molecular e aos componentes lipofílicos nos óleos essenciais que promovem alta penetração nas membranas celulares, aumentando a sua permeabilidade não específica. Esta hiperpermeabilidade promove o extravasamento de íons e a perda excessiva de outros componentes celulares, incluindo as proteínas intracelulares, resultando em morte celular (Devi, Nisha, Sakthivel & Pandian, 2010).

Quando comparado o método de difusão em disco com os valores da CIM na atividade antimicrobiana do OEC verificou-se que estes foram semelhantes, demonstrando que o método de difusão pode ser utilizado como método prévio por ser reconhecido e ter a capacidade de determinar a sensibilidade de muitos microrganismos a determinadas substâncias, sendo a técnica mais comum para a avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais. Além disso, é de fácil execução e requer pequenas quantidades da amostra. No entanto, o método oferece resultados semiquantitativos, enquanto o teste de diluição em caldo apresenta resultados quantitativos (Kalemba & Kunicka, 2003).

3.3. Potencial antimicrobiano do revestimento de quitosana e sua associação com o óleo essencial de cravo em filés de tambaqui contaminados intencionalmente

O efeito do revestimento à base de quitosana e sua associação com o OEC na redução de *E. coli*, *L. monocitogenes*, *P. aeruginosa*, *S. Enteritidis* e *S. aureus* está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Efeito do revestimento de quitosana e sua associação com o óleo essencial de cravo em filés de tambaqui contaminados intencionalmente com microrganismos patogênicos, mantidos sob armazenamento refrigerado (4°C).

Microrganismos	Cont. inicial	Tempo (horas)	Controle	T1	T2	T3
			log de UFC.g ⁻¹			
<i>S. aureus</i>	0	0	6,00 ^{Ba}	6,00 ^{Ca}	6,00 ^{Ca}	6,00 ^{Ba}
		24	4,33 ^{Ac}	4,73 ^{Bc}	3,10 ^{Bb}	1,13 ^{Aa}
		48	4,27 ^{Ab}	0,00 ^{Aa}	0,00 ^{Aa}	0,00 ^{Aa}
		72	4,07 ^{Ab}	0,00 ^{Aa}	0,00 ^{Aa}	0,00 ^{Aa}
<i>L. monocytogenes</i>	0	0	6,00 ^{Aa}	6,00 ^{Ba}	6,00 ^{Ba}	6,00 ^{Ca}
		24	5,58 ^{Ac}	3,40 ^{Ab}	1,80 ^{Aa}	3,83 ^{Bb}
		48	5,29 ^{Ab}	3,80 ^{Ab}	2,10 ^{Aa}	0,77 ^{Aa}
		72	4,92 ^{Ab}	3,89 ^{Ab}	0,94 ^{Aa}	0,00 ^{Aa}
<i>S. Enteritidis</i>	0	0	6,00 ^{Ca}	6,00 ^{Ca}	6,00 ^{Ca}	6,00 ^{Ca}
		24	5,31 ^{Bc}	4,69 ^{Bb}	4,22 ^{Ba}	4,74 ^{Bb}
		48	4,86 ^{Ac}	4,55 ^{Bc}	3,47 ^{Aa}	4,17 ^{Ab}
		72	5,18 ^{Abc}	4,08 ^{Aa}	3,73 ^{Aa}	4,52 ^{ABb}
<i>E. coli</i>	0	0	6,00 ^{Aa}	6,00 ^{Ca}	6,00 ^{Ca}	6,00 ^{Ba}
		24	6,06 ^{Ac}	5,50 ^{BCb}	5,27 ^{Bab}	4,93 ^{Aa}
		48	5,72 ^{Ab}	4,14 ^{Aa}	4,56 ^{Aa}	4,65 ^{Aa}
		72	6,11 ^{Ab}	5,05 ^{Ba}	5,68 ^{BCb}	4,81 ^{Aa}
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	6,00 ^{Aa}	6,00 ^{Ba}	6,00 ^{Ca}	6,00 ^{Ba}
		24	5,62 ^{Ac}	3,98 ^{Aab}	4,22 ^{Bb}	3,00 ^{Aa}
		48	5,41 ^{Ac}	3,19 ^{Ab}	3,62 ^{ABb}	1,99 ^{Aa}
		72	5,08 ^{Ac}	3,88 ^{Ab}	2,83 ^{Aab}	2,44 ^{Aa}

Cont. inicial: Contaminação inicial do pescado. Controle: amostra sem revestimento; T1: revestimento de quitosana 2%; T2: revestimento de quitosana 2% + 1.600 µg.mL⁻¹ de OEC; T3: revestimento de quitosana 0,5% + 800µg.mL⁻¹ de EOC; T4: BHT 100 mg.mL⁻¹. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05), sendo comparadas letras maiúsculas entre linhas e minúsculas entre colunas.

Os revestimentos de quitosana associada ao OEC nos filés de tambaqui mostrou-se eficaz na redução de *S. aureus* já nas primeiras 24 horas de armazenamento refrigerado, com redução de 2,9 ciclos log em T2 (3,10 log de UFC.g⁻¹) e ~4,9 ciclos log em T3 (1,13 log de UFC.g⁻¹) (Tabela 3). A inibição total de *S. aureus* foi alcançada a partir de 48 horas de armazenamento refrigerado para os tratamentos T1, T2 e T3, enquanto o controle apresentou redução de apenas ~2 ciclos log (4,27 log de UFC.g⁻¹). Tais valores se mantiveram inalterados até o final do período de armazenamento (p<0,05). O tratamento T3, apesar de apresentar menor concentração de quitosana e OEC foi o mais efetivo na redução do patógeno durante armazenamento refrigerado (p<0,05).

Assim como observado para *S. aureus*, o revestimento de quitosana associado ao OEC apresentou redução total para *L. monocytogenes*, porém esse efeito só foi observado para o tratamento T3 em 72 horas de armazenamento (Tabela 3). Nas primeiras 24 horas de armazenamento houve redução significativa de *L. monocytogenes* ($p < 0,05$) nos tratamentos T1, T2 e T3 de 2,6, 4,2 e 2,2 ciclos log de UFC.g⁻¹, respectivamente. A redução apresentada pelo controle não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). O revestimento a base de quitosana + OEC (T2 e T3) exerceu melhor efeito antilisterial reduzindo a carga microbiana em ~5 e 6 ciclos log de UFC.g⁻¹, respectivamente, a partir de 72 horas de armazenamento refrigerado, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Todos os tratamentos utilizados foram mais efetivos na redução das bactérias Gram positivas em relação às Gram negativas. *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* e *S. Enteretidis* apresentaram contagens superiores a 1,99 log de UFC.g⁻¹ nos tratamentos T1, T2 e T3 durante o armazenamento refrigerado por 72 horas, apresentando diferença estatística significativa quando comparados ao controle ($p < 0,05$) (Tabela 3). A menor contagem apresentada pelo controle foi de 4,86 log de UFC.g⁻¹ para *S. Enteretidis*.

A eficácia antimicrobiana do revestimento de quitosana nos filés de tambaqui na inibição e redução dos patógenos testados pode ser explicado por diversas razões. Primeiramente, a redução pode ser atribuída à propriedade de barreira ao oxigênio apresentado pela quitosana, reduzindo o número principalmente das bactérias de bactérias aeróbias como *P. aeruginosa* (Jeon, Kamil & Shahidi, 2002). A quitosana também é reconhecida como agente antimicrobiano natural (Wang & Wang, 2011; Cai et al., 2015) necessitando somente de sua verificação em matrizes alimentares complexas, uma vez que, seus constituintes possuem capacidade de interação com os componentes da matriz, como alginatos, pectinas, proteínas, polifosfatos e íons carregados positivamente (Aider, 2010). Além disso, a adição do OEC potencializa o efeito antimicrobiano intrínseco do revestimento de quitosana, aumentando a molhabilidade e as propriedades interfaciais do revestimento, importantes para melhorar a adesão da película a matriz alimentar, melhorando a propriedade antimicrobiana do polímero (Kurek, Galus & Debeaufort, 2014).

A diferença apresentada na inibição das bactérias Gram positivas (*L. monocytogenes* e *S. aureus*) e Gram negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. Enteretidis*) pelo revestimento de quitosana e sua associação com o OEC (Tabela 1) pode estar atribuída diretamente ao peso molecular da quitosana utilizada no presente estudo (>310 KDa), sendo que os polímeros de quitosana de alto peso molecular são mais efetivos contra bactérias Gram positivas. A quitosana de alto peso molecular tem a capacidade de formar filmes ao redor da célula das

bactérias Gram positivas e impedir a absorção de nutrientes, enquanto a de baixo peso molecular penetra mais facilmente ligando-se ao DNA nas bactérias Gram negativas (Devlieghere, Vermeiren & Debevere, 2004).

Outro fator que pode estar relacionado à diferença de inibição do revestimento entre as bactérias Gram positivas e Gram negativas são os envelopes celulares. O envelope celular de *L. monocytogenes* e *S. aureus* é composto principalmente por peptidoglicanos, dispostos em camadas e com abundância de poros que permitem facilmente a entrada de moléculas estranhas na célula. Enquanto, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. Enteritidis* além da camada de peptidoglicano possuem membrana celular externa composta por lipopolissacarídeos, fosfolípídeos e lipoproteínas, servindo como barreira à penetração de moléculas estranhas de alto peso molecular, como a quitosana (Mohamed & Al-Mehbad, 2013).

Listeria monocytogenes e *P. aeruginosa* mantiveram seu crescimento no tratamento controle durante as 72 horas de armazenamento refrigerado, não apresentando diferença estatística entre si ($p > 0,05$), porém os tratamentos T1, T2 e T3 diferiram estatisticamente entre 0, 24, 48 e 72 horas de armazenamento ($p < 0,05$) (Tabela 3). Esse comportamento não foi observado para *E. coli*, *S. Enteritidis* e *S. aureus*.

Tal comportamento observado para *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa* é atribuído à capacidade destes microrganismos em se desenvolverem em situações adversas como baixas temperaturas (Gonçalves, 2011). No presente trabalho estes microrganismos não sofreram ação da refrigeração e sim do revestimento aos quais foram submetidos. *Salmonella* Enteritidis e *S. aureus* sofreram influência da refrigeração nas primeiras 24 horas, no entanto, após esse período os microrganismos se adaptaram a nova condição e a ação foi específica do revestimento (T1, T2 e T3) (Tabela 3).

Resultados referentes a eficiência do revestimento de quitosana + OEC foram relatados por Upadhyay et al. (2015) ao analisarem o efeito da quitosana associada à fitoquímicos. Os autores mostraram a redução de *L. monocytogenes* (1-1,5 log UFC.g⁻¹) em salsichas revestidas com quitosana, entretanto, a incorporação de eugenol 0,4% (composto majoritário do OEC) aumentou significativamente a eficiência antimicrobiana do revestimento de quitosana, reduzindo as contagens de *L. monocytogenes* em pelo menos 4 a 5 log de UFC.g⁻¹ no final de 42 dias de armazenamento a 4°C, em comparação ao controle.

4. Conclusão

O revestimento de quitosana foi efetivo no controle de patógenos em filés de tambaqui. O sinergismo do revestimento de quitosana com o óleo essencial de cravo foi mais efetivo na inibição dos microrganismos, principalmente contra os patógenos Gram positivos.

Agradecimentos

A CAPES e a FAPESB pelo apoio financeiro, a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental – LABMAA.

Referências

- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *Food Science and Technology*, 43, 837-842.
- Atarés, L. & Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 51–62.
- Azevedo, V. V. C., Chaves, S. A., Bezerra, D. C., Lia Fook, M. V., & Costa, A. C. F. M. (2007). Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 2, 27-34.
- Baldwin, E. A., Nisperos, M. O., Hagenmaier, R. H., & Baker, R. A. (1997). Use of lipids in edible coatings for food products. *Food Technology*, 51, 56–62.
- Barbosa, L. N., Rall, V. L. M., Fernandes, A. A. H., Ushimaru, P. I., Probst, I. S., & Fernandes Jr, A. (2009). Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, 725-728.
- Bracey, D., Holyoak, C. D., & Coote, P. J. (1998). Comparison of the inhibition effect of sorbic acid and anphotericin B on *Sacharomyces cerevisiae*: is growth inhibition dependent on reduced intracelular pH? *Journal of Applied Microbiology*, 85, 1056-1066.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-256.
- Cai, J., Dang, Q., Liu, C., Wang, T., Fan, B., Yan, J., & Xu, Y. (2015). Preparation, characterization and antibacterial activity of O-acetyl-chitosan-N-2-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 8-15.

- Calo, J. R., Crandall, P. G, O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, 54, 111-119.
- Clsi. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2003). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. Approved standards M02-A08. Wayne, PA.
- Clsi. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Approved standards M07-A10. Wayne, PA.
- Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., & Pandian, S. K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 107-115.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., & Debevere, J. (2004) New preservation technologies: possibilities and limitations. *International Dairy Journal*,14, 273-285.
- Fao. Food and Agriculture Organization of The United Nations. Fisheries and Aquaculture topics. Composition of fish. (2005). <http://www.fao.org/fishery/topic/12318/en> Acesso 04.02.16.
- Fao – Food and Agriculture Organization of The United Nations. Farming the waters for people and food. (2010). <http://www.fao.org/docrep/015/i2734e/i2734e00.htm> Acesso 20.02.16.
- Feng, Y., & Xia, W. (2011). Preparation, characterization and antibacterial activity of water-soluble *O*-fumaryl-chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 28, 1169-1173.
- Gonçalves, A. A. (2011). *Tecnologia do Pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação*. (1th ed.). São Paulo: Atheneu, (Chapter 1).
- Hosseinnejad, M. & Jafari, S. M. (2016). Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 467-475.
- Iturriaga, L., Olabarrieta, I., & Marañón, M. (2012). Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. *International Journal of Food Microbiology*, 158, 58-64.
- Jay, J. M. (2005). *Microbiologia de alimentos*. (6th ed.). Porto Alegre: Artmed, (Chapter 5).

- Jeon, Y. J., Kamil, J. Y. V. A., & Shahidi, F. (2002). Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5167-5178.
- Kalemba, D. & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 813-829.
- Khachatryan, A. R., Hancock, D. D., Besser, T. E., & Call, D R. (2005). Antimicrobial drug resistance genes do not convey a secondary fitness advantage to calf-adapted *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 443-448.
- Kuete, V., Ngameni, B., Simo, C. C. S., Tankeu, R. K., Ngadjui, T., Meyer, J. J. M., Lall, N., & Kuate, J. R. (2008). Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 17-24.
- Kurek, M., Galus, S., Debeaufort, F. (2014). Surface, mechanical and barrier properties of bio-based composite films based on chitosan and whey protein. *Food Packaging and Shelflife*, 1, 56 – 67.
- Mittelstaedt, S. & Carvalho, V. M. (2006). *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7. *Revista Instituto de Ciências da Saúde*, 24, 175-182.
- Mohamed, N. A. & Al-mehbad, N. Y. (2013). Novel terephthaloyl thiourea cross linked chitosan hydrogels as antibacterial and antifungal agents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 111-117.
- Pozzatti, P., Loreto, E. S., Lopes, P. G., Athayde, M. L., Santurio, J. M., & Alves, S. H. (2009). Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. *Mycoses*, 53, 5-12.
- Ramos Filho, M. M. (2008). Perfil lipídico de quatro espécies de peixes da região pantaneira de Mato Grosso do Sul. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2, 361-365.
- Ruparelia, J. P., Chattejee, A. K., Duttgupta, S. P., & Mukherji, S. (2008). Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 4, 707-716.
- Santiago, J. A. S., Araújo, P. F. R., Santiago, A. P., Carvalho, F. C. T., & Vieira, R. H. S. F. (2013). Bactérias patogênicas relacionadas à Ingestão de pescados – revisão. *Arquivo de Ciências do Mar*, 46, 92-103.

- Sartoratto, A., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C. T., & Reder, V. L. G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 275-280.
- Settanni, L. & Corsetti, A. (2008) Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 123-138.
- Sidonio, L., Cavalcanti, I., Capanema, L., Morch, R., Magalhães, G., Lima, J., Burns, V., Alves Júnior, A. J., & Mungioli, R. (2012). Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. *BNDES*, 35, 421-463.
- Silva, N., Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. A., Taniwaki, N. H., Santos, R. F. S., Gomes, R. A. R., & Okazaki, M. M. (2010). *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água*. (4th ed.). São Paulo: Varela, (Chapter 3).
- Silveira, S. M., Cunha Jr, A., Scheuermann, G. N., Secchi, F. L., Verruck, S., Krohn, M., & Vieira, C. R. W. (2012). Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 71, 471-480.
- Sivakumar, D. & Bautista-Baños, S. (2014). A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection*, 64, 27–37.
- Soares, K. M. P., Gonçalves, A. A. (2012). Qualidade e segurança do pescado. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 71, p. 1-10.
- Soares, N. M., Mendes, T. S., Vicente, A. A. (2013). Effect of chitosan-based solutions applied as edible coatings and water glazing on frozen salmon preservation – A pilot-scale study. *Journal of Food Engineering*, 119, 316-323.
- Upadhyay, A., Upadhyaya, I., Karumathil, D. P., Yin, H., Nair, M. S., Bhattaram, V., Chen, C., Flock, G., Mooyottu, G., Venkitanarayanan, K. (2015). Control of *Listeria monocytogenes* on skinless frankfurters by coating with phytochemicals. *LWT – Food Science and Technology*, 63, 37-42.
- Usfda. (2013). GRAS notice inventory. <http://www.fda.gov> Acesso 07.07.17.
- Wang, J. & Wang, H. (2011). Preparation of soluble p-aminobenzoyl chitosan ester by Schiff's base and antibacterial activity of the derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48, 523-529.

Yadav, A. V., & Bhise, S. B. (2004). Chitosan: a potential biomaterial effective against typhoid. *Current Science*, 87, 1176-1178.

CAPÍTULO 3

Efeito do revestimento de quitosana associado ao óleo essencial de cravo na conservação de filés de tambaqui sob congelamento

Artigo a ser submetido a Revista Food Chemistry

Efeito do revestimento de quitosana associado ao óleo essencial de cravo na conservação de filés de tambaqui sob congelamento

Effect of chitosan coating associated with clove essential oil on the shelf life of tambaqui fillets under freezing

Brenda Borges Vieira^a, Elaine Araújo de Carvalho^a, Antonia Vicentina Nunes Rodrigues^a, Norma Suely Evangelista-Barreto^{a,*}

^a Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 44330 000, Bahia, Brasil.

Destaques:

- Foi avaliado o efeito do revestimento de quitosana e sua associação com o óleo essencial de cravo (OEC) na conservação de filés de tambaqui.
- O revestimento de quitosana podem efetivamente retardar a oxidação lipídica, inibir o crescimento de microrganismos psicrotróficos e reduzir alterações físico-químicas.
- O sinergismo apresentado no revestimento entre a quitosana e o OEC potencializou o efeito conservante do revestimento.
- O revestimento de quitosana com OEC prolonga a vida útil de filés de peixes.

1 **Efeito do revestimento de quitosana associado ao óleo essencial de cravo na conservação**
2 **de filés de tambaqui sob congelamento**

3

4 Effect of chitosan coating associated with clove essential oil on the shelf life of tambaqui
5 fillets under freezing

6

7 Brenda Borges Vieira^a, Elaine Araújo de Carvalho^a, Antonia Vicentina Nunes Rodrigues^a, Norma
8 Suely Evangelista-Barreto^{a,*}

9

10 ^a Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia,
11 Cruz das Almas, 44330 000, Bahia, Brasil.

12 ^{a*} Autor para correspondência: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa 710,
13 44330-000, Cruz das Almas, Bahia. Telefone: +55 075 988479484; e-mail:
14 nsevangelista@yahoo.com.br.

15

16 **Resumo**

17 O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do revestimento de quitosana e sua associação com
18 o óleo essencial de cravo (OEC) na conservação de filés de tambaqui mantidos sob
19 armazenamento congelado a -18°C. Os filés foram separados em grupos e submetidos aos
20 tratamentos: solução de quitosana 2% (T1), solução de quitosana 2% + OEC 1600 µg.mL⁻¹
21 (T2), solução de quitosana 0,5% + OEC 800 µg.mL⁻¹ (T3), solução de butilhidroxitolueno –
22 BHT 100 mg.mL⁻¹ (T4) e água destilada estéril (controle). Após os tratamentos, os filés foram
23 embalados individualmente em filmes plásticos de polietileno e armazenados sob
24 congelamento a -18°C ± 1°C durante 120 dias. As análises físico-químicas (pH, umidade,
25 lipídeos e oxidação lipídica) e microbiológica (bactérias psicrotróficas cultiváveis) foram
26 realizadas nos dias 1, 30, 60, 90 e 120 dias. A análise sensorial dos filés foi realizado por

27 meio da avaliação do perfil de características, múltipla escolha e ordem de preferência, sendo
28 aplicada a 40 provadores não treinados. Os resultados indicam que os tratamentos com
29 revestimento de quitosana e o revestimento de quitosana associada ao OEC retardaram
30 efetivamente a oxidação lipídica, inibiram o crescimento de bactérias psicrotróficas
31 cultiváveis e reduziram as alterações físico-químicas, como pH e umidade, durante o
32 congelamento. Os filés tratados foram aceitos pelos provadores, com médias superiores a 4.
33 Os revestimentos de quitosana e sua associação com o óleo essencial de cravo podem ser
34 promissores à utilização como conservantes naturais, visando a prolongar a vida útil dos filés
35 de tambaqui durante o armazenamento por congelamento.

36 **Palavras-chave:** *Collossoma macropomun*, congelamento, antimicrobianos naturais,
37 revestimentos edíveis.

38

39 **Abstract**

40 The objective of the work was evaluated in the framework of chitosan coating and its
41 association with clove essential oil (OEC) in the preservation of tambaqui fillets kept under
42 frozen storage at -18°C . The fillets were separated into groups and submitted to the
43 treatments: chitosan solution 2% (T1), chitosan solution 2% + OEC $1600\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (T2), 0.5%
44 chitosan solution + OEC $800\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (T3), butylhydroxytoluene-BHT solution $100\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
45 (T4) and sterile distilled water (control). After the treatments, the steaks were individually
46 packed in polyethylene plastic films and stored under freezing at $-18\ ^{\circ}\text{C} \pm 1\ ^{\circ}\text{C}$ for 120 days.
47 The physico-chemical analyzes (pH, moisture, lipids and lipid oxidation) and microbiological
48 (cultivable psychrotrophic bacteria) were performed on days 1, 30, 60, 90 and 120 days. The
49 sensory analysis of the steaks was carried out by means of the evaluation of the profile of
50 characteristics, multiple choice and order of preference, being applied to 40 untrained tasters.
51 The results indicate that chitosan coating treatments and OEC-associated chitosan coating

52 effectively retarded lipid oxidation, inhibited the growth of psychrotrophic arable bacteria,
53 and reduced physico-chemical changes, such as pH and moisture, during freezing. The treated
54 steaks were accepted by the tasters, with averages greater than 4. Chitosan coatings and their
55 association with clove essential oil may be promising for use as natural preservatives, in order
56 to extend the shelf life of tambaqui fillets during storage by freezing.

57 **Keywords:** *Colosoma macropomun*, freezing, natural antimicrobial, edible coatings.

58

59 1. Introdução

60 A quitosana é um biopolímero linear com ligações β (1 \rightarrow 4) de N-acetil-D-glucosamina
61 e D-glucosamina, com uma ampla gama de aplicações na indústria de alimentos
62 (Rudrapatnam & Farooqahmed, 2003). Devido à sua natureza não tóxica, biocompatibilidade,
63 biodegradabilidade, efeito antimicrobiano, antioxidante, capacidade de formação de filmes e
64 revestimentos protetores, a quitosana atraiu muita atenção como aditivo alimentar natural
65 (Jeon, Kamil & Shahidi, 2002; López-Caballero, Gómez-Guillén, Pérez-Mateos & Montero,
66 2005).

67 O pescado é considerado altamente suscetível a deterioração devido as suas
68 características intrínsecas e composição química. As alterações no pescado resultam em
69 mudanças provocadas por reações químicas como a oxidação dos lipídeos, reações
70 enzimáticas endógenas e atividades metabólicas dos microrganismos. Estas atividades levam
71 a redução da qualidade e vida útil do pescado (Arashisara, Hisara, Kayab & Yanik, 2004).

72 O congelamento é um método tradicional de conservação usado para controlar ou
73 diminuir as mudanças bioquímicas no pescado que ocorrem durante o armazenamento.
74 Contudo, o congelamento não inibe completamente o desenvolvimento microbiano e reações
75 químicas que levam à deterioração e redução da qualidade do pescado (Gonçalves, 2011).

76 Para manter as características de qualidade por mais tempo e prolongar a vida útil
77 durante o armazenamento é amplamente utilizado conservantes sintéticos como os nitritos,
78 nitratos, ácidos orgânicos, butilhidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT). Contudo, o
79 emprego desses compostos tem sido questionado devido à possível toxicidade, motivando a
80 busca por novos compostos ou ingredientes naturais que possam atuar isolados ou em
81 sinergismo com os aditivos químicos (Fan et al., 2009).

82 As especiarias são utilizadas há anos por atribuir sabor, aroma e odores característicos
83 aos alimentos (Kanatt, Chander & Sharma, 2008). Por possuir excelente compatibilidade com
84 outras substâncias, diversos estudos vem demonstrando que o efeito antimicrobiano e
85 antioxidante da quitosana é aumentado pela adição de óleos essenciais (Gómez-Estaca, López
86 de Lacey, López-Caballero, Gómez-Guillén & Montero, 2010; Kakaei & Shahbazi, 2016;
87 Sotelo-Boáys, Correa-Pacheco, Bautista-Banos & Corona-Rangel, 2017). *Syzygium*
88 *aromaticum* L., vulgarmente conhecido como cravo ou cravo-da-índia é uma especiaria rica
89 em eugenol, bem como diversas outras substâncias da classe dos triterpenos, ceras vegetais,
90 cetonas, resinas, taninos e esteróis (Silvestri et al, 2010). O eugenol é o principal constituinte
91 do óleo essencial dos botões florais de cravo fornecendo odor e sabor característicos, além de
92 ser o principal responsável por sua atividade conservante. É usado em todo o mundo como um
93 aditivo alimentar e aromatizante, sendo reconhecido como um alimento GRAS (*Generally*
94 *Recognized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos EUA (Manso, Pezo,
95 Gomez-Lus & Nerin, 2014) e está ganhando popularidade devido à sua natureza volátil, o que
96 facilita o uso de pequenas concentrações seguras para consumo (Sivakumar & Bautista-
97 Banos, 2014).

98 A incorporação de óleos essenciais em filmes e revestimentos de quitosana, além de
99 melhorar o seu efeito antimicrobiano e antioxidante, também possuem a capacidade de reduzir
100 a permeabilidade ao vapor d'água e aos gases (Yanishlieva, Marinova, Gordon & Raneva,

101 1999). Assim, é desejável o desenvolvimento de revestimentos conservantes que mantenham
102 a qualidade e prolonguem a vida útil de pescado. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito
103 do revestimento de quitosana associado ao óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) na
104 conservação de filés de tambaqui (*Collossoma macropomum*) armazenados sob congelamento.

105

106 **2. Material e métodos**

107 *2.1. Obtenção da quitosana e óleo essencial de cravo*

108 Foi utilizada a quitosana de alto peso molecular (310 KDa), com grau de desacetilação
109 de 91,5% obtida da POLYMAR Indústria e Comércio LTDA (Fortaleza, Ceará, Brasil). O
110 óleo essencial de cravo - OEC foi obtido comercialmente em frascos âmbar, lacrados, com
111 volume de 10 mL da empresa Terra Flor Aromaterapia© (Alto Paraíso, Goiás, Brasil).

112

113 *2.2. Obtenção e preparação das amostras de tambaqui*

114 Os tambaquis foram adquiridos no pesque pague Capixaba, em Amélia Rodrigues,
115 Bahia, acondicionados em caixas térmicas e transferidos para o Laboratório de Tecnologia do
116 Pescado na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Foram adquiridos tambaquis vivos,
117 com peso médio de 3-4 Kg que foram decapitados e filetados à mão.

118

119 *2.3. Preparação da solução de revestimento*

120 A solução de revestimento foi preparada por dissolução da quitosana em ácido láctico a
121 1% (v/v), utilizando agitador magnético durante 2 horas (Cahú et al., 2012). A solução foi
122 previamente esterilizada usando luz UV durante 15 minutos antes de ser utilizado no
123 revestimento dos filés.

124

125 *2.4. Avaliação da vida de prateleira dos filés de tambaqui*

126 A CIM da quitosana a ser utilizada foi definida como 2% e do EOC como 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$,
127 capazes de inibir todos os microrganismos testados.

128 Os filés foram submetidos ao revestimento por imersão na solução de quitosana durante
129 10 segundos com secagem durante 1 minuto a 25°C. Os filés foram submetidos aos seguintes
130 tratamentos: T1 (solução de quitosana a 2%), T2 (solução de quitosana a 2% + OEC 1600
131 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), T3 (solução de quitosana a 0,5% + OEC 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), T4 (solução do antioxidante
132 BHT 100 mg.mL^{-1} – butilhidroxitolueno) e o controle (água estéril). Os filés pertencentes a
133 cada tratamento foram embalados em filmes plásticos de polietileno e armazenados a $-18^\circ\text{C} \pm$
134 1°C durante 120 dias. As análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas durante
135 o período experimental de 1, 30, 60, 90 e 120 dias.

136

137 *2.4.1. Análises físico-químicas*

138 *2.4.1.1. pH*

139 O pH das amostras foi determinado usando medidor de pH Tecnal TEC11 padronizado
140 com tampões de pH 4,0 e pH 7,0. Aproximadamente 10g da amostra de cada grupo foi
141 misturado com 100mL de água destilada estéril, triturada e o pH medido (Instituto Adolf
142 Lutz, 2008). O experimento foi conduzido em triplicata.

143

144 *2.4.1.2. Umidade*

145 O teor de umidade das amostras foi avaliado pelo método de secagem direta em estufa a
146 105°C de acordo com o Instituto Adolf Lutz (Instituto Adolf Lutz, 2008), onde foram pesadas
147 5g das amostras e aquecidas durante 3 horas. Posteriormente, foram esfriadas em dessecador e
148 pesadas. As operações de aquecimento e resfriamento foram repetidas até obtenção de peso
149 constante. O experimento foi conduzido em triplicata.

150

151 2.4.1.3. *Lipídeos totais*

152 Os lipídeos totais das amostras foram determinados pelo método de Bligh-Dyer de
153 acordo com o Instituto Adolf Lutz (Instituto Adolf Lutz, 2008). Foi pesado 50g de cada
154 amostra proveniente dos quatro tratamentos e adicionado 150 mL de clorofórmio-metanol
155 (1:2). Em seguida, foi adicionado 50 mL de clorofórmio e 50 mL de água. As amostras foram
156 agitadas, filtradas e transferidos para o funil de separação. Após completa separação e
157 clarificação foi recolhida a camada inferior e colocado para aquecer até a completa remoção
158 do solvente. Posteriormente, as amostras foram colocadas em estufa a 105°C por 1 hora,
159 esfriadas em dessecador e pesadas. As operações de aquecimento e resfriamento foram
160 repetidas até obtenção de peso constante. O experimento foi conduzido em triplicata.

161

162 2.4.1.4. *Oxidação lipídica - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)*

163 A oxidação lipídica foi avaliada pela mensuração das substâncias reativas ao ácido
164 tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com a metodologia descrita por Buege e Aust (1978), com
165 modificações.

166 Alíquotas de 10g de cada amostra do filé de tambaqui foram homogeneizadas em 50 mL
167 de ácido tricloroacético a 7,5% e filtrada em papel de filtro qualitativo. Foram medidos 5 mL
168 do filtrado, em triplicata, em tubos rosqueados e adicionados de 5 mL de ácido tiobarbitúrico
169 a 0,02 M. A mistura foi aquecida em banho de água a 100°C durante 10 minutos para o
170 desenvolvimento de uma coloração cor-de-rosa e depois resfriada em gelo. A leitura da
171 absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 532 nm. Para quantificação dos níveis de
172 TBARS nas amostras utilizou-se a equação $Y=0,0575x-0,0489$ com $R^2=0,99$, obtida a partir
173 da curva padrão do 1,1,3,3-tetraetoxipropano. O resultado foi expresso em miligrama de
174 malonaldeído por kg de filé (mg de MDA eq.kg⁻¹).

175

176 *2.4.2. Análise microbiológica*

177 A análise de bactérias psicrotróficas cultiváveis foi realizada por meio de semeadura de
178 profundidade de acordo com Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e
179 Água (Silva et al., 2010).

180

181 *2.4.3. Análise sensorial*

182 A análise sensorial dos filés de tambaqui dos diferentes tratamentos foi realizada por
183 meio da análise do perfil de características utilizando uma escala hedônica de sete pontos com
184 a intensidade de cada atributo (sabor, aroma, cor, textura e aparência visual) a ser avaliado e a
185 análise de comparação múltipla de acordo com Minin (2013) (Anexo 1). Também foi
186 solicitado aos provadores para ordenar as amostras de acordo com sua preferência. Foram
187 utilizados números aleatórios para identificação das amostras.

188 Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
189 (TCLE) antes de realizarem a análise sensorial, constatando que não possuíam alergia aos
190 ingredientes do produto testado e que estavam cientes dos possíveis desconfortos e riscos do
191 consumo do produto. O projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da
192 Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (CEP-UFRB) e aprovado com número de
193 parecer 1.766.529.

194

195 *2.5. Análises estatísticas*

196 Os dados foram compilados no programa LibreOffice 5.1, submetidos a análise de
197 variância (ANOVA) e as médias obtidas avaliadas segundo o teste de Tukey a 5% de
198 significância ($p < 0,05$).

199

200 **3. Resultados e discussão**

201 3.1. Análises físico-químicas

202 3.1.1. pH

203 A Tabela 1 apresenta o pH das amostras de filés de tambaqui durante o período de
 204 armazenamento. O pH inicial das amostras de filés de tambaqui foi de 6,35, onde a aplicação
 205 do revestimento de quitosana, OEC e BHT não apresentaram efeito estatístico significativo
 206 nos valores iniciais de pH ($p < 0,05$). A legislação brasileira, de acordo com o Regulamento da
 207 Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), considera
 208 deteriorado o pescado com valores de pH igual ou superior a 6,5, sendo os filés utilizados no
 209 experimento caracterizados como frescos (Brasil, 2001).

210

211 **Tabela 1.** pH das amostras de filés de tambaqui revestidos com quitosana e óleo essencial de
 212 cravo sob armazenamento congelado a -18°C .

Tempo (dias)	pH				
	Controle	T1	T2	T3	T4
1	6,35 ^{Aa}	6,35 ^{Aba}	6,35 ^{Aa}	6,35 ^{Aa}	6,35 ^{Aa}
30	6,33 ^{Aab}	6,30 ^{Aa}	6,35 ^{Aabc}	6,45 ^{Abc}	6,48 ^{Abc}
60	6,43 ^{Aa}	6,61 ^{Cb}	6,51 ^{Bab}	6,42 ^{Aa}	6,75 ^{Cc}
90	6,44 ^{Aa}	6,37 ^{Aba}	6,77 ^{Cb}	6,36 ^{Aa}	6,66 ^{CDB}
120	6,73 ^{Bb}	6,43 ^{Ba}	6,48 ^{Aa}	6,44 ^{Aa}	6,55 ^{BCa}

213 Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), sendo comparadas letras
 214 maiúsculas entre linhas e minúsculas entre colunas. Controle: amostra sem revestimento; T1: revestimento de
 215 quitosana 2%; T2: revestimento de quitosana 2% + $1.600 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de OEC; T3: revestimento de quitosana 0,5%
 216 + $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de OEC; T4: BHT 100mg.mL^{-1} .

217

218 A partir de 30 dias de armazenamento os valores de pH começaram a diferir do
 219 controle. Os tratamentos T1 e T2 com valores de pH próximos a 6,35 e os tratamentos T3 e
 220 T4 apresentando ligeiro aumento de pH, de 6,45 e 6,48 respectivamente. No intervalo de 60 e
 221 90 dias as amostras apresentaram aumento nos valores de pH, com excessão do T3. O
 222 aumento do pH está associado a produção e acúmulo de compostos alcalinos, como amônia e
 223 trimetilamina, por enzimas endógenas ou devido à ação microbiana sobre o pescado (Manat,

224 Soottawat, Wonnop & Cameron, 2005), já que as amostras apresentaram bactérias
225 psicotróficas em contagens superiores a 0,61 log de UFC.g-1. O aumento do pH favorecido
226 pelos compostos aminados favorece o desenvolvimento microbiano, pela aproximação do pH
227 neutro, considerado ótimo para o crescimento dos microrganismos (Jay, 2005). O pH dos files
228 revestidos após 120 dias de armazenamento variou de 6,43 a 6,55, com controle apresentando
229 pH de 6,73, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos ($p < 0,05$). Os filés de tambaqui
230 revestidos com quitosana, OEC e BHT apresentaram com menores valores de pH ao final do
231 armazenamento quando comparado a amostra não revestida (controle),.

232 Fan et al. (2009) ao avaliarem o efeito de revestimentos de quitosana sobre a qualidade
233 e vida de prateleira de carpa sob armazenamento congelado verificaram que os baixos valores
234 de pH das amostras revestidas com quitosana podem potencializar a inibição microbiana e
235 contribuir para a preservação dos peixes por meio da redução da atividade das proteases
236 endógenas e microbianas.

237

238 3.1.2. Umidade

239 Os valores referentes a umidade dos filés de tambaqui tratados se encontram na Tabela
240 2. O valor inicial de umidade nos filés de tambaqui foi de 71,8%, sendo o controle o único
241 grupo que apresentou redução estatística significativa da umidade após o final do período de
242 armazenamento ($p < 0,05$).

243 Os filés de tambaqui no tratamento T2 apresentaram percentuais de umidade mais altos
244 no final do armazenamento ($72,99\% \pm 1,9$), seguido pelos filés revestidos com quitosana a 2%
245 (T1)($72,1\% \pm 1,1$). O envolvimento dos filés de tambaqui com revestimento de quitosana
246 associado ao OEC evitou a desidratação e ressecamento da superfície dos mesmos. Isto se
247 deve a quitosana apresentar elevada afinidade e capacidade de retenção água, servindo como
248 barreira de proteção nos filés congelados (Assis & Silva, 2003). Um dos grandes problemas

249 relacionados ao congelamento de filés de peixe é a desidratação ou secagem devido à área de
 250 superfície exposta, resultando na queima pelo frio e perda de peso, conduzindo a diminuição
 251 de sua qualidade (Vanhaecke, Verbeke & Brabander, 2010).

252

253 **Tabela 2.** Valores de umidade (%) das amostras de filés de tambaqui revestidos com
 254 quitosana e óleo essencial de cravo sob armazenamento congelado a -18°C.

Tempo (dias)	Umidade (%)				
	Controle	T1	T2	T3	T4
1	71,8 ± 2,1 ^{ABa}	71,8 ± 2,1 ^{Aa}	71,8 ± 2,1 ^{ABa}	71,8 ± 2,1 ^{Aa}	71,8 ± 2,1 ^{Aa}
30	72,1 ± 0,8 ^{ABa}	63,1 ± 2,5 ^{Bb}	70,8 ± 1,2 ^{ABa}	70,7 ± 1,2 ^{Aa}	71,7 ± 2,6 ^{Aa}
60	75,0 ± 0,2 ^{Aa}	69,7 ± 1,8 ^{Ab}	74,9 ± 1,0 ^{Aa}	73,5 ± 2,6 ^{Aab}	71,7 ± 1,3 ^{Aab}
90	72,1 ± 2,6 ^{ABa}	71,3 ± 1,3 ^{Aa}	70,4 ± 1,7 ^{Ba}	72,3 ± 1,1 ^{Aa}	69,5 ± 1,6 ^{Aa}
120	68,5 ± 2,1 ^{Bb}	72,1 ± 1,1 ^{Aab}	72,9 ± 1,9 ^{ABa}	70,6 ± 2,2 ^{Aab}	69,9 ± 1,1 ^{Aab}

255 Valor de umidade expressa com a média das três repetições ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais
 256 não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05), sendo comparadas letras maiúsculas entre linhas e minúsculas
 257 entre colunas. Controle: amostra sem revestimento; T1: revestimento de quitosana 2%; T2: revestimento de
 258 quitosana 2% + 1.600 µg.mL⁻¹ de OEC; T3: revestimento de quitosana 0,5% + 800 µg.mL⁻¹ de OEC; T4: BHT
 259 100 mg.mL⁻¹.

260

261 3.1.3. Lipídeos totais

262 Os teores de lipídeos totais nos filés de tambaqui se encontram na Tabela 3. O valor
 263 inicial de lipídeos totais nos filés de tambaqui do controle foi de 7,16%, indicando teor médio
 264 de gordura (Sales & Maia, 2013). Diferentes valores foram encontrados por outros autores em
 265 tambaquis como Sales e Maia (2013) com valor de 3,8%, Almeida, Batista, Kodaira e Lessi
 266 (2006) com valor de 7,6% e Cartonilho e Jesus (2011) com valor de 7,69%. Tais variações
 267 nos teores de lipídeos dos peixes está fortemente relacionada à nutrição, estação de captura,
 268 variação sexual, tamanho do peixe, bem como as condições ambientais (González-Fandos,
 269 Villarino-Rodríguez, Garcia-Linares, Garcia-Arias & Garcia-Fernández, 2005).

270

271

272 **Tabela 3.** Teor de lipídeos totais dos filés de tambaqui revestidos com quitosana e óleo
 273 essencial de cravo durante armazenamento congelado a -18°C.

Tempo (dias)	Teor de lipídeos (%)				
	Controle	T1	T2	T3	T4
1	7,16 ^{Cc}	7,14 ^{Ea}	7,22 ^{Be}	7,19 ^{Cd}	7,15 ^{Db}
30	7,16 ^{Bc}	6,96 ^{Ba}	7,20 ^{Ad}	7,20 ^{Dd}	7,10 ^{Bd}
60	7,00 ^{Ab}	7,00 ^{Cb}	7,28 ^{Cd}	7,10 ^{Ac}	6,95 ^{Aa}
90	7,36 ^{Ec}	6,90 ^{Aa}	7,20 ^{Ad}	7,16 ^{Bc}	7,14 ^{Cb}
120	7,31 ^{Db}	7,03 ^{Da}	7,38 ^{De}	7,36 ^{Ed}	7,34 ^{Ec}

274 Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), sendo comparadas letras
 275 maiúsculas entre linhas e minúsculas entre colunas. Controle: amostra sem revestimento; T1: revestimento de
 276 quitosana 2%; T2: revestimento de quitosana 2% + 1.600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de OEC; T3: revestimento de quitosana 0,5%
 277 + 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de OEC; T4: BHT 100 mg.mL^{-1} .
 278

279 Após o tratamento dos filés, os valores iniciais de lipídeos variaram de 7,15% a 7,22%,
 280 sendo que, os filés tratados com o OEC aumentaram significativamente o teor de lipídeo
 281 ($p < 0,05$), com valores de 7,22% (T2) e 7,19% (T3). A quitosana, por ser um polímero
 282 catiônico apresenta excelente compatibilidade com outras substâncias, sendo capaz de aderir
 283 ou agregar lipídeos e gorduras carregados negativamente (Wydro, Krajewska & Hac-Wydro,
 284 2007; Duan, Cherian & Zhao, 2010). O OEC utilizado nos tratamentos T2 e T3, por ser um
 285 lipídeo, tiveram a capacidade de aumentar o teor de lipídeos encontrado nos filés revestidos.

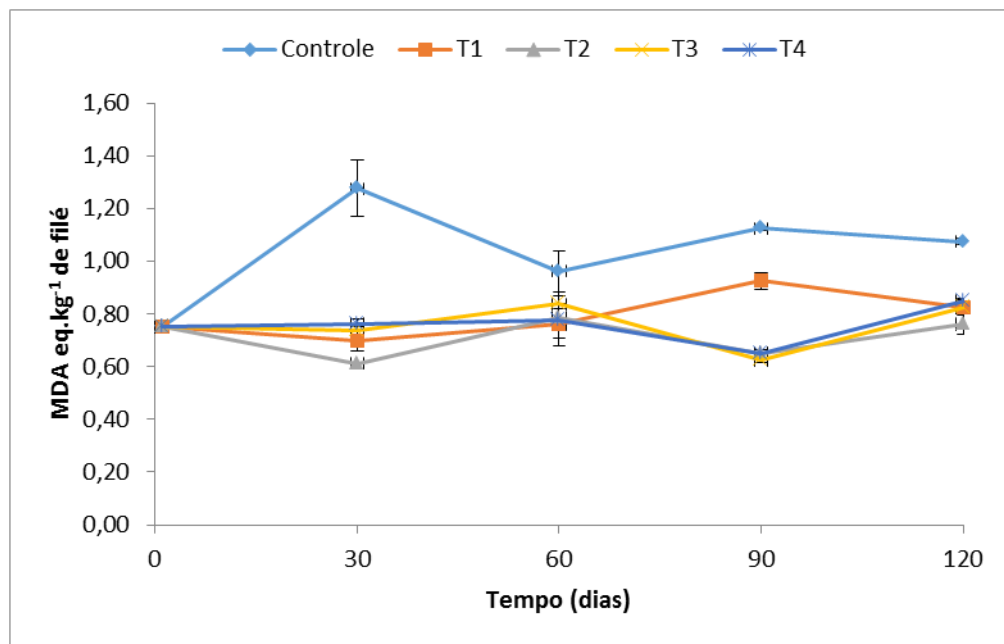
286 As amostras de cada tratamento (T1, T2, T3 e T4) apresentaram variações em seus
 287 teores de lipídeos, diferindo estatisticamente entre si no decorrer do armazenamento por 120
 288 dias ($p < 0,05$). Segundo Nunes (2014), durante a avaliação dos resultados deve-se considerar a
 289 individualidade das amostras, uma vez que as amostras de tambaqui foram provenientes de
 290 peixes diferentes e de partes diferentes de um mesmo filé, apesar de terem sido submetidas
 291 aos mesmos tratamentos, apresentando assim variados teores de lipídeos.

292

293 *3.1.4. Oxidação lipídica - TBARS*

294 Em temperaturas abaixo de 0°C, a oxidação lipídica torna-se o principal fator de
 295 alterações organolépticas, sendo particularmente importante para a vida útil do pescado
 296 (Soares, Mendes & Vicente, 2013). Na Figura 1 são apresentados os valores de TBARS para
 297 os diferentes tratamentos durante o período de armazenamento.

298 **Figura 1.** Valores de TBARS em MDA eq.kg⁻¹ de filés de tambaqui durante o período
 299 armazenado de 120 dias.



300

301 Controle: amostra sem revestimento; T1: revestimento de quitosana 2%; T2: revestimento de
 302 quitosana 2% + 1.600 µg.mL⁻¹ de OEC; T3: revestimento de quitosana 0,5% + 800 µg.mL⁻¹ de EOC;
 303 T4: BHT 100 mg.mL⁻¹.

304

305 O valor inicial de TBARS das amostras de tambaqui foi de 0,75 mg de malonaldeído
 306 eq.kg⁻¹ de filé (mg MDA eq.kg⁻¹). Os valores de TBARS das amostras revestidas começaram
 307 a diferir da amostra controle ao decorrer do tempo de armazenamento (Figura 1). O nível mais
 308 alto de MDA foi alcançado após 30 dias de armazenamento na amostra controle com valor de
 309 1,28 mg MDA eq.kg⁻¹ de filé, enquanto os tratamentos apresentaram valores variando de 0,76
 310 a 0,61 mg MDA eq.kg⁻¹ de filé. Este aumento está relacionado à presença de lipases e

311 fosfolipases endógenas nos filés que continuam ativas durante o congelamento (Fidalgo,
312 Saraiva, Aubourg, Vázquez & Torres, 2014).

313 O valor de TBARS da amostra controle apresentou maior valor de MDA aos 30 dias de
314 armazenamento (1,28 mg eq.kg⁻¹), atingindo valor de 1,08 mg de filé ao final de 120 dias,
315 enquanto nos tratamentos T1, T2, T3 e T4 apresentaram, respectivamente, valores de 0,83,
316 0,76, 0,83 e 0,85 mg MDA eq.kg⁻¹ de filé, diferindo significativamente (p<0,05), com
317 exceção dos tratamentos T1 e T3 que não diferiram entre si (p>0,05). As reações em cadeia
318 dos radicais livres na oxidação lipídica são iniciados pela reação do oxigênio na dupla ligação
319 dos ácidos graxos. A propriedade de barreira ao oxigênio da quitosana fez com que no
320 revestimento dos filés esta atuasse diminuindo a difusão do oxigênio e retardando a oxidação
321 lipídica (Sathivel, 2005). Além disso, a capacidade da quitosana em se ligar aos lipídeos,
322 como os óleos essenciais, exerce um papel importante na sua capacidade antioxidante (Duan,
323 Cherian & Zhao, 2010).

324 De acordo com Ibrahim Sallam (2007) o nível máximo de TBARS que indica boa
325 qualidade do peixe congelado, refrigerado ou armazenado em gelo é de 5 mg MDA eq.kg⁻¹ de
326 filé, embora o peixe possa ser consumido até o nível máximo de 8 mg MDA eq.kg⁻¹ de filé.
327 No presente estudo, os valores de TBARS tanto para o controle como para os tratamentos
328 foram inferiores aos limites propostos ao longo dos 120 dias de armazenamento.

329 Os resultados obtidos estão de acordo com Fan et al. (2009), que encontraram valores
330 de TBARS mais baixos em carpa prata revestida com quitosana a 2% durante 30 dias de
331 congelamento. A carpa prata revestida com quitosana apresentou valores de TBARS (0,83 mg
332 MDA.kg⁻¹ de filé) inferior aos filés não revestidos (3,00 mg MDA.kg⁻¹ de peixe).

333 Os tratamentos T1 e T3 apresentaram os mesmo valores de MDA eq.kg⁻¹ de filé (0,83)
334 após 120 dias, inferindo que o sinergismo do OEC a 800 µg.mL⁻¹ com a quitosana a 0,5%
335 possui a mesma eficiência na redução da oxidação lipídica nos filés de tambaqui congelados

336 que o revestimento de quitosana a 2%. Quando a solução de quitosana a 2% foi adicionada de
337 OEC a $1600 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (T2) tal sinergismo foi mais efetivo na redução da oxidação lipídica,
338 apresentando o menor valor de MDA eq.kg^{-1} de filé (0,76) após os 120 dias de congelamento
339 ($p < 0,05$). Este fato mostra que a quitosana apresentou inibição na oxidação lipídica nos filés
340 de tambaqui e o sinergismo com o OEC potencializou tal efeito. O tratamento com BHT a 100
341 mg.mL^{-1} (T4), apresentou valores próximos (Figura 2) aos demais tratamentos, comprovando
342 que revestimentos contendo antioxidantes naturais apresentam igual ou maior capacidade de
343 redução da oxidação lipídica em peixes do que o BHT, que é um antioxidante sintético
344 permitido pela legislação brasileira.

345

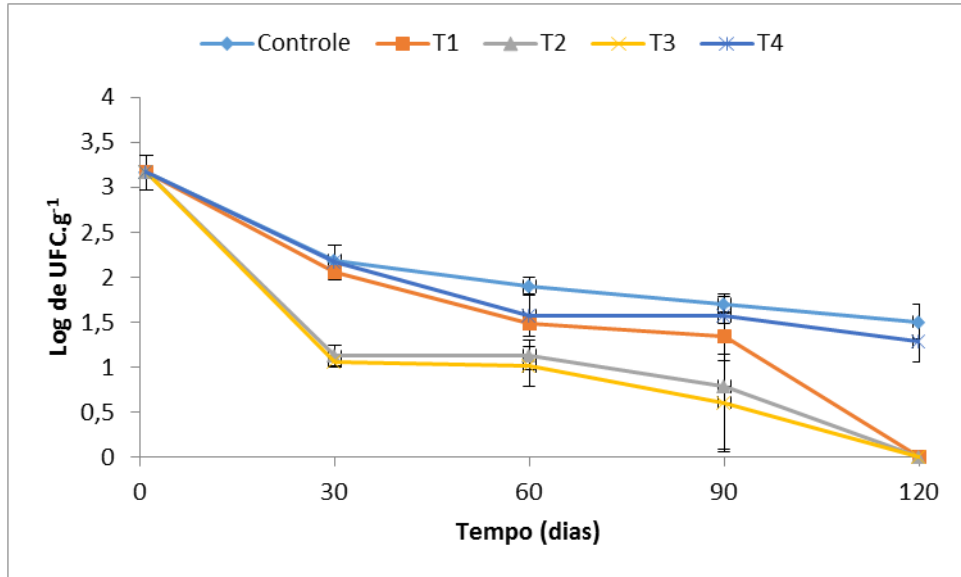
346 3.2. Análise microbiológica

347 3.2.1. Bactérias psicrotróficas cultiváveis

348 As bactérias psicrotróficas são microrganismos capazes de se multiplicar em baixas
349 temperaturas e apesar da legislação brasileira não estabelecer padrões em pescado, sua
350 quantificação é importante por causar alterações físico-químicas e organolépticas, diminuindo
351 a vida útil do pescado, além de indicar condições inadequadas de higiene durante
352 processamento quando presentes em elevadas contagens (Martins, Vaz & Minozzo, 2002).
353 Os valores das contagens das bactérias psicrotróficas cultiváveis nos filés de tambaqui se
354 encontram na Figura 2.

355

356 **Figura 2.** Valores médios da contagem de bactérias psicrotróficas cultiváveis em filés de
357 tambaqui revestidos com quitosana e OEC armazenados sob congelamento a -18°C .



358

359 Controle: amostra sem revestimento; T1: revestimento de quitosana 2%; T2: revestimento de
 360 quitosana 2% + 1.600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de OEC; T3: revestimento de quitosana 0,5% + 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de EOC;
 361 T4: BHT 100 mg.mL^{-1} .

362

363 Todas as amostras apresentaram decréscimo em sua contagem no decorrer do tempo de
 364 armazenamento por 120 dias. No decorrer dos primeiros 30 dias de armazenamento, a
 365 contagem inicial de 3,16 log de UFC.g⁻¹ passou para 2,19 log de UFC.g⁻¹ (controle), 2,05 log
 366 de UFC.g⁻¹ (T1), 1,13 log de UFC.g⁻¹ (T2), 1,06 log de UFC.g⁻¹ (T3) e 2,16 log de UFC.g⁻¹
 367 (T4), apresentando redução estatística significativa nos tratamentos contendo o revestimento
 368 de quitosana associado ao óleo essencial de cravo dos demais tratamentos ($p < 0,05$). Ao final
 369 do período de 120 dias, o controle e o tratamento T4 apresentaram contagens de 1,51 e 1,28
 370 log de UFC.g⁻¹, respectivamente, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (T1, T2 e
 371 T3, $p < 0,05$) que reduziram totalmente a contagem de bactérias psicrotróficas cultiváveis nos
 372 filés de tambaqui devido a ação da quitosana e do OEC (0 log de UFC.g⁻¹).

373 O tratamento com BHT (T4) não apresentou efeito antimicrobiano sobre as bactérias
 374 psicrotróficas, não diferindo estatisticamente do controle, o que era esperado, já que esse
 375 aditivo atua somente como antioxidante em alimentos. A quitosana individualmente, na
 376 concentração de 2%, apresentou efeito antimicrobiano somente após 120 dias de
 377 armazenamento, enquanto o revestimento de quitosana associados ao OEC nas diferentes

378 concentrações apresentou efeito antimicrobiano desde os primeiros 30 dias, mantendo-se até o
379 final do período de armazenamento. O OEC por apresentar também atividade antimicrobiana
380 potencializou o efeito antimicrobiano da quitosana por meio do sinergismo apresentado entre
381 eles, mesmo em concentrações menores (T3), não diferindo estatisticamente entre si ($p < 0,05$).
382 O efeito inibitório da quitosana frente aos microrganismos psicrotróficos está relacionado à
383 formação de complexos polieletrólíticos ao redor da célula bacteriana, uma vez que os grupos
384 amínicos protonados se ligam seletivamente à membrana celular carregada negativamente,
385 alterando a atividade celular e a permeabilidade da membrana, resultando na inibição
386 microbiana (Yadav & Bhise, 2004; Feng & Xia, 2011). Quanto ao OEC, sua atividade está
387 relacionada ao eugenol (Jirovetz et al., 2006), composto majoritário presente no OEC que
388 permite a ruptura da membrana citoplasmática dos microrganismos, aumentando a sua
389 permeabilidade não específica (Gill & Holly, 2006).

390

391 *3.3. Análise sensorial*

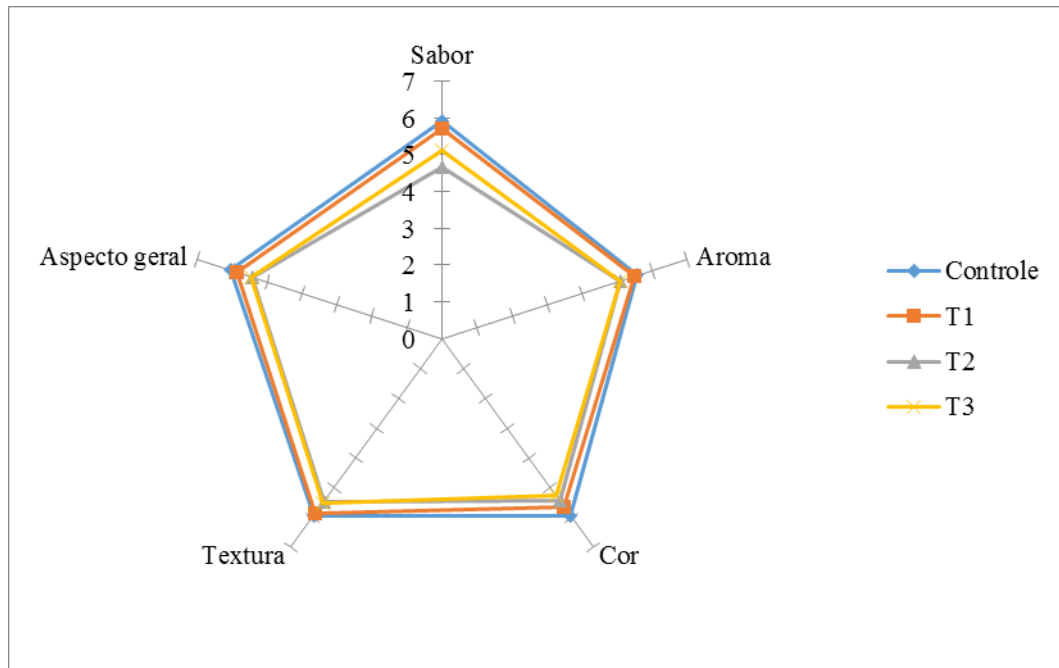
392 *3.3.1. Perfil das características sensoriais*

393 Dos provadores participantes, trinta foram mulheres e dez homens, totalizando 40
394 participantes, entre docentes e discentes da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Do
395 total de julgadores, 31 possuíam faixa etária entre 18 e 29 anos, 8 de 30 a 42 anos e 1 superior
396 a 50 anos.

397 Os resultados dos atributos de qualidade dos filés de tambaqui se encontram na Figura
398 3. Verifica-se que os filés revestidos com quitosana e com quitosana + OEC obtiveram
399 aceitação dos provadores com médias em todos os atributos analisados superior a 4 que
400 significa “nem gostei/nem desgostei”, sem nenhuma média 3.

401

402 **Figura 3.** Avaliação dos atributos de qualidade dos filés de tambaqui revestidos de quitosana
 403 e sua associação com o OEC.



404

405 Amostra referência: controle; 101: revestimento de quitosana 2%; 202: revestimento de quitosana 2% + OEC
 406 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 303: revestimento de quitosana 0,5% + OEC 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.
 407

408 3.3.2. Análise de comparação múltipla

409 Após avaliação da amostra controle, 32,5% dos provadores avaliaram o filé como
 410 “gostei extremamente”, 42,5% “gostei muito” e 25% “gostei”. Quando comparado a amostra
 411 controle com as amostras T1, T2 e T3 foram obtidas médias de 6,05, 5,03 e 3,93, com as
 412 médias entre “gostei muito”, “gostei” e “não gostei/nem desgostei”, respectivamente, tendo
 413 uma menor aceitação as amostras que tinham sido adicionadas o OEC. Apesar de comprovada
 414 a atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais (Sartoratto et al., 2004; Silveira
 415 et al., 2012; Calo, Crandall, O'Bryan & Ricke, 2015) uma das maiores limitações do seu uso é
 416 o efeito negativo na qualidade sensorial dos filés. O efeito negativo no uso do OEC em
 417 biofilmes ativos na qualidade sensorial de alimentos foi verificado por Ugalde (2014),
 418 relatando que mesmo com o OEC incorporado no biofilme e não diretamente na matriz
 419 alimentar, o efeito não foi menos pronunciado.

420

421 *3.3.3. Ordenação de acordo com a preferência*

422 Após a avaliação dos atributos de qualidade dos filés de tambaqui foi possível observar
423 que os filés da amostra controle e T1 apresentaram a maior preferência, seguido das amostras
424 revestidas com quitosana + OEC. Possivelmente, a maior rejeição às amostras revestidas com
425 quitosana + OEC (T2 e T3) tenha sido a rejeição a característica aromática intensa ou o cravo
426 não ser uma especiaria frequentemente utilizada na preparação de peixes.

427

428 **4. Conclusão**

429 Os revestimentos de quitosana associado ao óleo essencial de cravo podem ser
430 utilizados como conservantes naturais nos filés de tambaqui durante o congelamento, visando
431 prolongar a vida útil dos filés de tambaqui, retardando a ação oxidativa e microbiana.

432

433 **Agradecimentos**

434 A CAPES e a FAPESB pelo apoio financeiro, a Universidade Federal do Recôncavo da
435 Bahia, ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental – LABMAA.

436

437 **Referências**

438 Almeida, N. M., Batista, G. M., Kodaira, M. & Lessi, E. (2006). Alterações *post-mortem* em
439 tambaqui (*Colossoma macropomum*) conservados em gelo. *Ciência Rural*, 36, 1288-1293.

440 Arashisara, S., Hisara, O., Kayab, M., & Yanik, T. (2004). Effects of modified atmosphere
441 and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout
442 (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 209–214.

- 443 Assis, O. B. G. & Silva, V. L. (2003). Caracterização estrutural e da capacidade de absorção
444 de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. *Polímeros:
445 Ciência e Tecnologia*, 13, 223-228.
- 446 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da inspeção
447 industrial e sanitária de produtos de origem animal - RIISPOA. (2001).
448 <http://www.agricultura.gov.br/sda.2010> Acesso 29.06.17.
- 449 Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. In: S. Fleischer, & L.
450 Packer (Eds.), *Methods in enzymology*. (pp. 302-310). New York: Academic Press.
- 451 Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods
452 - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-256.
- 453 Cahú, T. B., Santos, S. D., Mendes, A., Córdula, C. R., Chavante, S. F., Carvalho Jr, L. B.,
454 Nader, H. B., & Bezerra, R. S. (2012). Recovery of protein, chitin, carotenoids and
455 glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste.
456 *Process Biochemistry*, 47, 570-577.
- 457 Calo, J. R., Crandall, P. G, O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as
458 antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, 54, 111-119.
- 459 Cartonilho, M. M. & Jesus, R. S. (2011). Qualidade de cortes congelados de tambaqui.
460 *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46, 344-350.
- 461 Duan, J., Cherian, G., & Zhao, Y. (2010). Quality enhancement in fresh and frozen lingcod
462 (*Ophiodon elongates*) fillets by employment of fish oil incorporated chitosan coatings. *Food
463 Chemistry*, 119, 524-532.
- 464 Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y., & Chi, Y. (2009). Effects of chitosan coating
465 on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food Chemistry*, 115, 66-70.

- 466 Feng, Y., & Xia, W. (2011). Preparation, characterization and antibacterial activity of water-
467 soluble *O*-fumaryl-chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 83, 1169-1173.
- 468 Fidalgo, L. G., Saraiva, J. A., Aubourg, S. P., Vázquez, M., & Torres, J. A. (2014). Effect of
469 high-pressure pre-treatments on enzymatic activities of Atlantic mackerel (*Scomber*
470 *scombrus*) during frozen storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 23,
471 18-24.
- 472 Gill, A. O. & Holly, R. A. (2006). Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and
473 *actobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food*
474 *Microbiology*, 108, 1–9.
- 475 Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., &
476 Montero, P. (2010). Biodegradable gelatinechitosan films incorporated with essential oils as
477 antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27, 889-896.
- 478 González-Fandos, E., García-Linares, M. C., Villarino-Rodríguez, A., Garcia-Arias, M. T., &
479 García-Fernández, M. C. (2005). Evaluation of the microbiological safety and sensory quality
480 of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processed by the *sous vide* method. *Food*
481 *Microbiology*, 21, 193-201.
- 482 Gonçalves, A. A. (2011). *Tecnologia do Pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação*.
483 (1th ed.). São Paulo: Atheneu, (Chapter 1).
- 484 Ibrahim Sallam, K. (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium
485 lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*, 18, 566–575.
- 486 Instituto Adolf Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. (2008).
487 [http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.p](http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf)
488 [df](http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf) Acesso 29.06.17.
- 489 Jay, J. M. (2005). *Microbiologia de alimentos*. (6th ed.). Porto Alegre: Artmed, (Chapter 5).

- 490 Jeon, Y. I., Kamil, J. Y. V. A., & Shahidi, F. (2002). Chitosan as an edible invisible film for
491 quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,
492 20, 5167–5178.
- 493 Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., & Schmidt, E. (2006).
494 Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *Journal of*
495 *Agricultural Food Chemistry*, 54, 6303–6307.
- 496 Kakaei, S., & Shahbazi, Y. (2016). Effect of chitosan-gelatin film incorporated with ethanolic
497 red grape seed extract and *Ziziphora clinopodioides* essential oil on survival of *Listeria*
498 *monocytogenes* and chemical, microbial and sensory properties of minced trout fillet. *LWT –*
499 *Food Science and Technology*, 72, 432-438.
- 500 Kanatt, S. R., Chander, R., & Sharma, A. (2008). Chitosan and mint mixture: A new
501 preservative for meat and meat products. *Food Chemistry*, 107, 845–852.
- 502 López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., & Montero, P. (2005). A
503 chitosan–gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, 19, 303–311.
- 504 Manat, C., Soottawat, B., Wonnop, V., & Cameron, F. (2005). Changes of pigments and
505 colour in sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) muscle during
506 iced storage. *Food Chemistry*, 93, 607–617.
- 507 Martins, C. V. B., Vaz, S. K., & Minozzo, M. G. (2002). Aspectos sanitários de pescados
508 comercializados em “pesque-pagues” de Toledo (PR). *Revista Higiene Alimentar*, 16, 51-56.
- 509 Manso, S., Pezo, D., Gomez-Lus, R., & Nerin, C. (2014). Diminution of aflatoxin B1
510 production caused by an active packaging containing cinnamon essential oil. *Food Control*,
511 45, 101-108.
- 512 Minim, V. P. R. (2013). *Análise sensorial: estudos com consumidores*. (3th ed.). Viçosa:
513 UFV, (Chapter 2).

- 514 Rudrapatnam, N. T., & Farooqahmed, S. K. (2003). Chitin the undisputed biomolecule of
515 great potential. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 43, 61–87.
- 516 Sales, R. O. & Maia, E. L. (2013). Composição química e classes de lipídeos em peixe de
517 água doce tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade*
518 *Animal*, 7, 31-44.
- 519 Sartoratto, A., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C. T., &
520 Reder, V. L. G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic
521 plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 275-280.
- 522 Sathivel, S. (2005). Chitosan and protein coatings affect yield, moisture loss, and lipid
523 oxidation of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during frozen storage. *Journal of*
524 *Food Science*, 70, 455–459.
- 525 Silva, N., Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. A., Taniwaki, N. H., Santos, R. F. S., Gomes, R.
526 A. R., & Okazaki, M. M. (2010). *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de*
527 *Alimentos e Água*. (4th ed.). São Paulo: Varela, (Chapter 3).
- 528 Silveira, S. M., Cunha Jr, A., Scheuermann, G. N., Secchi, F. L., Verruck, S., Krohn, M., &
529 Vieira, C. R. W. (2012). Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais.
530 *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 71, 471-480.
- 531 Silvestri, J. D. F., Paroul, N., Czyewski, E., Lerin, L., Rotava, I, Cansian, R. L., Mossi, A.,
532 Toniazzo, G., Oliveira, D., & Treichel, H. (2010). Perfil da composição química e atividades
533 antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*
534 Thunb.). *Revista Ceres*, 57, 589-594.
- 535 Sivakumar, D., & Bautista-Banos, S. (2014). A review on the use of essential oils for
536 postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection*,
537 64, 27-37.

- 538 Soares, N. M., Mendes, T. S., & Vicente, A. A. (2013). Effect of chitosan-based solutions
539 applied as edible coatings and water glazing on frozen salmon preservation – A pilot-scale
540 study. *Journal of Food Engineering*, 119, 316-323.
- 541 Sotelo-Boáys, M. E., Correa-Pacheco, Z. N., Bautista-Banos, S., & Corona-Rangel, M. L.
542 (2017). Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules
543 incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne
544 pathogens. *LWT – Food Science and Technology*, 77, 15-20.
- 545 Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Ruiz, H. A., Martins, J. T., Casariego, A., Teixeira, J. A.,
546 & Vicente, A. A. (2010). Effect of chitosan-based coatings on the shelf life of salmon
547 (*Salmon salar*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11456–11462.
- 548 Vanhaecke, L., Verbeke, W., & Brabander, H. F. (2010). Glazing of frozen fish; analytical
549 and economic challenges. *Analytica Chimica Acta*, 672, 40-44, 2010.
- 550 Wydro, P., Krajewska, B., & Hac-Wydro, K. (2007). Chitosan as a lipid binder: a langmuir
551 monolayer study of chitosan–lipid interactions. *Biomacromolecules*, 8, 2611–2617.
- 552 Yadav, A. V., & Bhise, S. B. (2004). Chitosan: a potential biomaterial effective against
553 typhoid. *Current Science*, 87, 1176-1178.
- 554 Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H., & Raneva, V. G. (1999). Antioxidant
555 activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food*
556 *Chemistry*, 64, 59–66.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A quitosana e o OEC apresentaram atividade antimicrobiana frente aos patógenos testados, principalmente contra os patógenos Gram positivos.
- O revestimento de quitosana apresentou efeito antimicrobiano promissor para utilização no controle de patógenos em filés de tambaqui. No entanto, o sinergismo do revestimento de quitosana com o OEC mostrou-se mais efetivo na inibição dos microrganismos.
- Os valores de TBARS dos filés revestidos com quitosana e quitosana associada ao OEC foram significativamente menores quando comparados com o controle, indicando que os revestimentos inibiram a oxidação lipídica dos filés de tambaqui.
- O revestimento de quitosana, bem como o revestimento associado ao OEC, garantiram a qualidade microbiológica dos filés pois permitiram uma redução gradual das bactérias psicotróficas cultiváveis no decorrer do armazenamento sob congelamento.
- Os filés revestidos com quitosana apresentaram aceitação sensorial dos provadores, tendo uma menor aceitação as amostras adicionadas de OEC.
- Assim, os revestimentos de quitosana e quitosana associada ao OEC nos filés de tambaqui proporcionaram uma melhor qualidade microbiológica do produto, impediram a oxidação lipídica, o aumento dos valores de pH e perda de umidade. Dessa forma, os revestimentos podem ser eficazes na conservação e aumento da vida útil dos filés de tambaqui.

ANEXOS

- Ficha análise sensorial

NOME: _____ IDADE: ____ anos

SEXO: M() F()

Você está recebendo amostras de filés de peixe revestidas com quitosana associada ao óleo essencial de cravo.

Por favor, prove a amostra referência (R) e indique o quanto você gostou ou desgostou do produto. Marque a resposta que melhor reflita seu julgamento.

Código da amostra: **R (amostra referência)**

- () Gostei extremamente
 () Gostei muito
 () Gostei
 () Não gostei/nem desgostei
 () Desgostei
 () Desgostei muito
 () Desgostei extremamente

Compare a amostra referência (R) com as amostras codificadas, como mais preferida ou menos preferida, de acordo com seu julgamento. Em seguida, classifique a intensidade da preferência de acordo com a escala apresentada.

Código da amostra:	101	202	303
Mais preferida que R	_____	_____	_____
Preferida igual a R	_____	_____	_____
Menos preferida que R	_____	_____	_____

Intensidade da preferência	101	202	303
Nenhuma	_____	_____	_____
Pequena	_____	_____	_____
Moderada	_____	_____	_____
Grande	_____	_____	_____
Extrema	_____	_____	_____

Ordem das amostras por preferência:

1° _____ 2° _____ 3° _____ 4° _____

NOME: _____ IDADE: ____ anos

SEXO: M() F()

Você está recebendo amostras de filés de peixe revestidas com quitosana associada ao óleo essencial de cravo. Utilize a escala abaixo para avaliar os atributos de qualidade e anote o valor de sua avaliação para cada amostra na tabela a seguir.

- (1) Desgostei extremamente
- (2) Desgostei muito
- (3) Desgostei
- (4) Não gostei/nem desgostei
- (5) Gostei
- (6) Gostei muito
- (7) Gostei extremamente

Atributos de qualidade:

Atributos	Amostra R	101	202	303
Sabor				
Aroma				
Cor				
Textura				
Aspecto geral				