



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina.

Campus Jaraguá do Sul

Curso Técnico em Química (Modalidade: Integrado)

Douglas Kviatkowsky Junior

Eloisa Gabriela Frare

Fabricio Natan Fischer

Matheus Ernan Reichert

Maurício Montanha Junior

Nathalia Eger Junckes

**EXTRAÇÃO DE QUITINA DA CASCA DE CRUSTÁCEOS PARA PRODUÇÃO DE
BIOFILMES A BASE DE QUITOSANA E ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM
(*Rosmarinus Officinalis*)**

Jaraguá do Sul, 2016.

Douglas Kviatkowsky Junior

Eloisa Gabriela Frare

Fabricio Natan Fischer

Matheus Ernan Reichert

Maurício Montanha Junior

Nathalia Eger Junckes

**EXTRAÇÃO DE QUITINA DA CASCA DE CRUSTÁCEOS PARA PRODUÇÃO DE
BIOFILMES A BASE DE QUITOSANA E ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM
(*Rosmarinus Officinalis*)**

Projeto de pesquisa desenvolvido no eixo formativo diversificado “Conectando os Saberes” do Curso Técnico em Química (Modalidade: Integrado) do Instituto Federal Santa Catarina - Campus Jaraguá do Sul.

Orientador: Elder Correa Leopoldino

Jaraguá do Sul, 2016.

SUMÁRIO

1. TEMA	4
2. DELIMITAÇÃO DE TEMA	4
3. PROBLEMA	4
4. HIPÓTESES	4
5. OBJETIVOS	5
5.1 Objetivo Geral.....	5
5.2 Objetivos Específicos.....	5
6. JUSTIFICATIVA	6
7. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	7
7.1 Quitina e Quitosana.....	7
7.1.1 Aplicações.....	8
7.1.2 Extração da quitina e produção da quitosana.....	9
7.2 Óleos essenciais.....	10
7.2.1 Óleo essencial de alecrim.....	11
7.3 Embalagens Ativas.....	12
7.3.1 Filmes de Quitosana contendo Óleo Essencial.....	14
7.4 Instrumentação de análise.....	15
7.4.1 Espectroscopia no Infravermelho.....	16
7.4.2 Cromatografia Gasosa.....	17
8. METODOLOGIA	19
8.1 Extração da quitina e produção da quitosana.....	19
8.1.1 Caracterização da quitina e da quitosana.....	20
8.2 Extração e caracterização do óleo essencial do alecrim.....	20
8.3 Produção de biofilmes a base de quitosana e aplicação do óleo essencial de alecrim....	21
8.4 Análise das características físico-químicas dos biofilmes.....	21
8.4.1 Índice de Transparência.....	21
8.4.2 Absorção de água.....	22
8.4.3 Grau de Desacetilação.....	22
8.4.4 Espessura.....	23
8.4.5 Vapor de água.....	23
8.5 Análise da resistência a tração do Biofilme.....	24
9. CRONOGRAMA	25
10. REFERÊNCIAS	26

PROJETO DE PESQUISA

1. TEMA

Extração de quitina da casca de crustáceos para produção de biofilmes à base de quitosana e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus Officinalis*).

2. DELIMITAÇÃO DE TEMA

Extração e desacetilação da quitina obtida a partir da casca de crustáceos para produção de biofilmes a base de quitosana e obtenção de óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por meio do processo de hidrodestilação para aplicação nos mesmos.

3. PROBLEMA

O mercado pesqueiro de crustáceos gera grandes quantidades de resíduos, entre eles estão as cascas de camarão e siri, estas apresentam o biopolímero quitina em sua composição, que após sofrer o processo de desacetilação transforma-se em quitosana. Sabendo que a inserção de óleos essenciais nos biofilmes a base de quitosana alteram algumas de suas características, questiona-se: Quais as características físico-químicas e mecânicas que se modificam ao adicionarmos óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) ao biofilme de quitosana?

4. HIPÓTESES

- A extração de quitina terá um rendimento maior proveniente da casca do camarão em relação à casca do siri;
- A síntese de biofilmes com a quitosana obtida será de fácil realização e terá altos rendimentos;
- A hidrodestilação com o uso do aparelho de *Clevenger* se mostrará eficiente para a extração do óleo essencial;
- O biofilme com a presença do óleo possui um menor índice de absorção de água em relação ao filme de quitosana;
- O biofilme com a presença do óleo apresenta maior índice de transparência do que o filme sem óleo essencial de alecrim;
- O grau de desacetilação da quitosana será maior que 50%;

- O biofilme contendo óleo essencial apresentará menor permeabilidade de vapor de água;
- O biofilme sem a presença do óleo essencial apresentará maior espessura;
- O biofilme contendo o óleo essencial é mais resistente a tração em relação ao biofilme sem óleo essencial de alecrim.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Caracterizar e avaliar as características físico-químicas e mecânicas do biofilme a base de quitosana contendo ou não o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*).

5.2 Objetivos Específicos

- Extrair a quitina a partir da casca de dois crustáceos (camarão e siri);
- Produzir a quitosana através do processo de desacetilação da quitina;
- Caracterizar a quitina e a quitosana através de espectroscopia no infravermelho
- Extrair o óleo essencial de alecrim através do método de hidrodestilação;
- Caracterizar o óleo essencial por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS);
- Produzir biofilmes a base de quitosana e óleo essencial de alecrim através do método de Casting;
- Analisar as características físico-químicas dos biofilmes de quitosana contendo óleo essencial de alecrim por meio de aparelho de incidência de luz, absorção de água, grau de desacetilação, espessura e vapor de água;
- Analisar a resistência mecânica através do aparelho de tração;
- Comparar as características do biofilme a base de quitosana contendo óleo essencial de alecrim com o biofilme somente a base de quitosana.

6. JUSTIFICATIVA

A pesca de crustáceos como camarões e siris ocorre em Santa Catarina desde o início da ocupação e colonização do litoral catarinense, concentrando-se nos municípios de São Francisco do Sul, Florianópolis e Laguna. Os meses de maior pesca encontram-se no intervalo de dezembro a junho sendo pescados em média cerca de 100 toneladas desses crustáceos nesse período. Vale ressaltar que grande parte é descartado de volta ao mar, como a casca do camarão e do siri. Estas cascas são compostas por quitina, um polissacarídeo que ao sofrer o processo de desacetilação produz a quitosana, outro polissacarídeo cuja resistência e é alta e de fácil fabricação, podendo agregar valor comercial ao mesmo.

A quitosana é um biopolímero que vem sendo aplicado em indústrias de alimentos, pois possui propriedades antimicrobianas, além de ser um polímero abundante na natureza e de fonte renovável. Outra aplicação da quitosana, é na fabricação de biofilmes ativos para auxiliar na duração dos alimentos, ou seja, as embalagens são necessárias para proteger o alimento e estas combinadas à quitosana tornam o mesmo mais resistente e menos poluente.

Essas embalagens, além de conter somente quitosana, podem apresentar óleos essenciais em sua composição, o óleo altera as composições físico-químicas do filme e aumenta a atividade antimicrobiana do mesmo. Estudos foram realizados incorporando óleo essencial de canela com quitosana para produção de biofilmes, que causou modificação à resistência mecânica do biofilme, a permeabilidade ao vapor de água, o teor de umidade e à solubilidade. Estes biofilmes são uma nova tendência da tecnologia de alimentos para assegurar a qualidade dos mesmos, bem como a segurança do consumidor.

Frente a estas informações, optou-se por extrair o óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis*), pois o mesmo é de fácil acesso e pode ser obtido das folhas da planta através do processo de hidrodestilação com rendimento de 0,5% a 1,5%, além de apresentar alto papel antimicrobiano e antifúngico quando inserido em biofilmes a base de quitosana.

7. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Hoje existem várias pesquisas publicadas relacionadas à quitosana e materiais desenvolvidos a partir dessa, que podem ser empregados em áreas tecnológicas e biomédicas, pois esta é uma esfera atraente (LARANJEIRA e FÁVARE, 2009).

Outra utilização dos rejeitos provenientes desses crustáceos, é para a produção da quitina e da quitosana através do processo de desacetilação. Este biopolímero junto aos óleos essenciais, vem sendo aplicado na produção de biofilmes afim de dar maior proteção aos alimentos.

7.1 Quitina e Quitosana

A quitina é um polímero natural extraído de exoesqueletos de crustáceos e insetos, porém quando extraída de crustáceos possui maior rendimento. A quitosana é um polissacarídeo que deriva da quitina, é insolúvel em água e em meio apolar, apresenta estrutura cristalina, sendo solúvel em ácidos fracos (DIAS, 2013).

Sua estrutura é formada pela repetição de unidades β -(1,4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose, uma estrutura que apresenta semelhanças com a da celulose, mas apresenta características diferentes devido a presença do grupo amino (Figura 1). A quitosana é obtida através da desacetilação da quitina, o que substitui os grupos acetilas (-COCH₃) por grupos aminos (-NH₂), que protonam em meio ácido (DIAS, 2013).

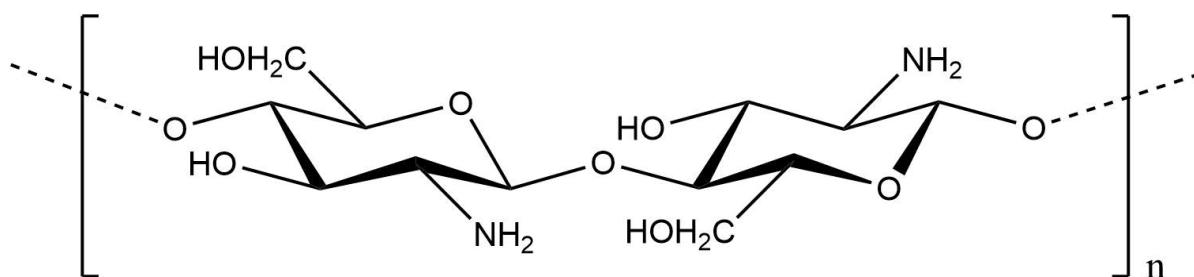


Figura 1: Estrutura molecular da quitosana.

Fonte: Adaptado de Assis e Silva (2003).

A massa molar média da quitina é geralmente maior que 10⁶ Daltons, enquanto a quitosana comercial tem uma massa molar média na faixa de 1.0 x 10⁵ - 1.2 x 10⁶ Daltons. Esse biopolímero pode facilmente se dissolver em soluções de ácidos fracos diluídos sendo o ácido acético o solvente mais empregado (LARANJEIRA e FÁVERE, 2009).

A quitosana possui uma alta hidrofiliçidade o que permite sua utilização como biomaterial na forma de micropartículas, gel e membrana em diversas aplicações. Ela pode ser modificada fisicamente, sendo uma das vantagens mais interessantes a sua grande versatilidade em ser preparado em diferentes formas, tais como pós, flocos, microesferas, nanopartículas, membranas, esponjas, colmeias, fibras e fibras ocas (LARANJEIRA e FÁVERE, 2009).

A quitosana, quitina e seus oligômeros, possuem outras propriedades que vem sendo estudadas tais como biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade. Essas propriedades fazem com que a quitina e seus derivados sejam utilizados em várias áreas, tais como: indústria alimentícia, biomedicina, agricultura, biotecnologia, veterinária entre outras (LARANJEIRA e FÁVERE, 2009).

7.1.1 Aplicações

Segundo Ferreira e Ancelmo (s.d.) a quitosana apresenta grupos aminos livres que são muito reativos devido a sua tendência a adquirir carga positiva ao reagirem em certas soluções, sendo assim podem reagir com compostos dotados de cargas negativas tais como proteínas, ácidos graxos entre outros. Devido a esta característica, ela pode ser utilizada nas áreas farmacêutica, alimentícia e da saúde.

Na área da saúde a quitosana é utilizada para inibir a absorção de gordura pelo organismo. Em vários casos já estudados foi visto que os cátions da quitosana atraem a carga negativa dos ácidos graxos e biliares, resultando em um composto que o intestino não consegue digerir, e que é expelido do corpo com os demais coliformes fecais (LIMA, 2005).

Estudos foram realizados com a quitosana para utilização como cobertura de alimentos ou revestimentos protetores em frutas e alimentos altamente perecíveis (SHAHIDI, 1999). Estas pesquisas tem maior enfoque nas propriedades fungicidas e bactericidas da quitosana (COMA, 2002). A quitosana apresenta propriedades antimicrobianas e estimulantes do sistema imune, as quais são manifestadas na aceleração de cicatrização de feridas. Já na indústria alimentícia, a quitina, através de pirólise, forma importantes aromatizantes como a pirazina, que está presente em vários alimentos (DAMIAN et.al, 2005).

De acordo com Damian et.al (2005), foram inibidos totalmente o crescimento do fungo *Aspergillus flavus* em milho e em amendoim após tratamento com quitosana. Também foi inibido o crescimento do fungo *Botrytis spp* com o tratamento de quitosana em beringela.

Outras pesquisas apresentam a eficiência da capacidade da quitosana em controlar o crescimento de fungos em frutas e vegetais, durante a fase de estocagem e distribuição dos produtos.

7.1.2 Extração da quitina e produção da quitosana

O processo de obtenção da quitina segue as etapas de pré-tratamento, desmineralização, desproteíntização, desodorização e secagem, como apresenta a Figura 2.

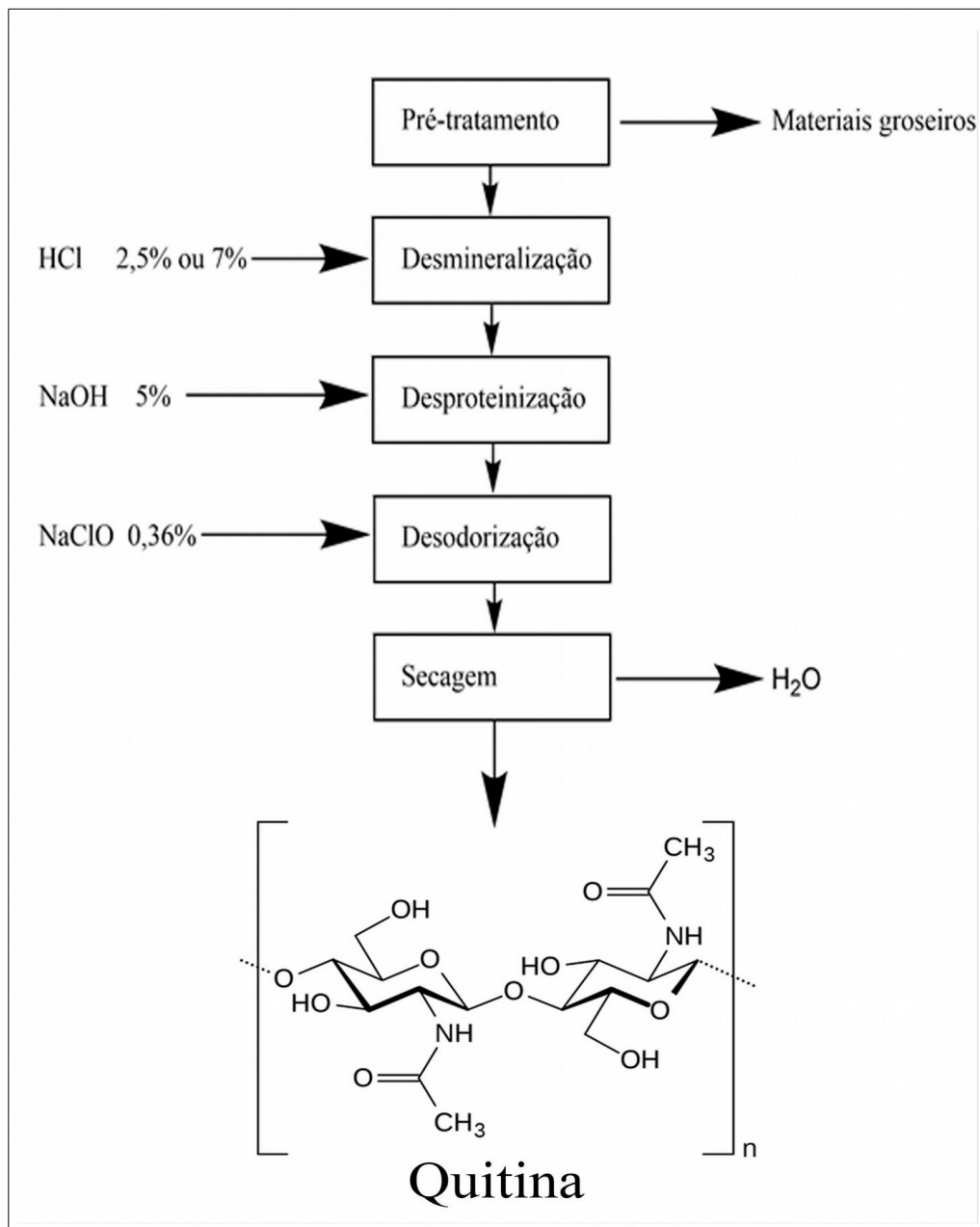


Figura 2: Etapas de obtenção da quitina.

Fonte: Adaptado de Almeida et.al (2006).

Segundo Almeida et.al (2006), no pré-tratamento há a retirada do material grosseiro utilizando-se tratamento com água corrente e a diminuição da granulometria das cascas de camarão e siri através da moagem. Já a etapa de desmineralização, utiliza de uma solução de ácido clorídrico reduzir o teor de cinzas da matéria prima.

A desproteíntização tem como finalidade reduzir o teor de nitrogênio e tem base em adicionar uma solução de hidróxido de sódio á matéria prima. Na desodorização a matéria prima é disposta em um tanque com solução de hipoclorito de sódio sob agitação, assim reduzindo o odor e os pigmentos. Após esta etapa é feita a neutralização e secagem do material (ALMEIDA et. al. 2006).

A síntese da quitosana é realizada a partir da desacetilação da quitina em solução de hidróxido de sódio. No final da reação deve ser feita a lavagem da amostra até que esta neutralize, em seguida a mesma deve ser filtrada e seca. Ao final desta etapa se obtém a quitosana (ALMEIDA et. al. 2006).

Esta metodologia utilizada por Almeida et. al. (2006) para a produção de quitosana se mostrou adequada, pois apresentou um bom rendimento, sendo que este foi de 2,4% para os resíduos de camarão e de 5% para os resíduos de siri, comparando com a massa inicial de camarão e siri.

7.2 Óleos essenciais

Óleos essenciais são compostos originários do metabolismo de plantas aromáticas, os seus componentes pertencem a dois grupos quimicamente distintos, os terpenóides e os fenilpropanóides. O óleo pode ser extraído por diferentes métodos como a passagem a frio, turbodestilação, arraste de vapor/destilação a vapor, hidrodestilação entre outros (KOCH, LEITZKE e MONZANI, s.d.).

Entre os processos de obtenção do óleo essencial se destacam a destilação a vapor e a hidrodestilação, porém essa última é mais utilizada para menores escalas, pois resulta em maiores rendimentos mesmo que necessite de uma maior quantidade de tempo para execução. O processo consiste em deixar a matéria-prima do vegetal submersa em água com temperaturas abaixo de 100°C evitando assim perda de compostos sensíveis a altas temperaturas. Para este processo em laboratório pode ser utilizado o aparelho de clewenger para executar a extração (Figura 3) (AZAMBUJA, 2012).

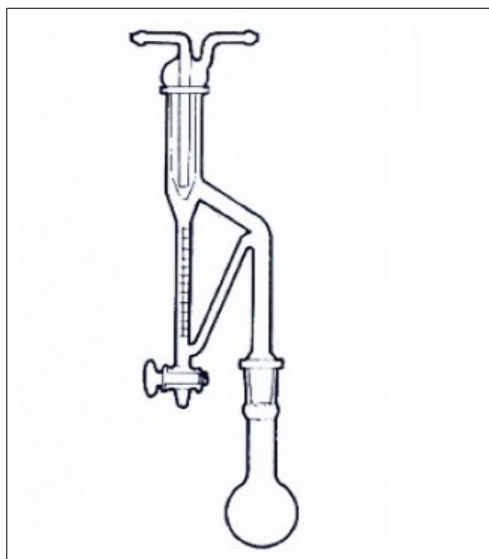


Figura 3: Aparelho de Clevenger.

Fonte: Metaquímica (2016).

Segundo Miranda et.al (2016), o uso de óleos essenciais vem aumentando nas indústrias, sendo utilizado como agente antioxidante natural no lugar de antioxidantes sintéticos. Outro fator é que uma grande gama dos óleos essenciais apresentam características antimicrobianas, cerca de 35%, e 65% apresentam características antifúngicas (MONTES, SANTANA e CRUZ, 2013), assim aumentando os benefícios que os óleos essenciais trazem.

Com esses benefícios e várias pesquisas utilizando os óleos essenciais junto a polímeros vem sendo feitas, podemos dar exemplo a pesquisa de Souza et. al. (2014) que traz a utilização de óleo de canela com nanopartículas de polímeros para repelir a atividade microbiana. O óleo de alecrim assim como o de canela, apresenta atividades antimicrobianas e também vem sendo muito estudado quanto a suas aplicações (UGALDE, 2014).

7.2.1 Óleo essencial de alecrim

A espécie *Rosmarinus officinalis* é uma planta da família Lamiaceae originária das áreas ao redor do mar Mediterrâneo, sendo atualmente cultivada em quase todo território brasileiro. O óleo essencial de alecrim é obtido através de suas folhas e possui cor e odor característico (UGALDE, 2014).

Normalmente se obtém o óleo essencial a partir de destilação a vapor d'água e esse método possui um rendimento de 7 a 10g por kg da planta. Em sua composição química são encontrados princípios ativos terapêuticos, antioxidantes, aromatizantes, entre outros.

(UGALDE, 2014). Os principais componentes do óleo essencial de alecrim são: alfa-Pineno, beta-Mirceno, 1,8 cineol e verbenona (Figura 4).

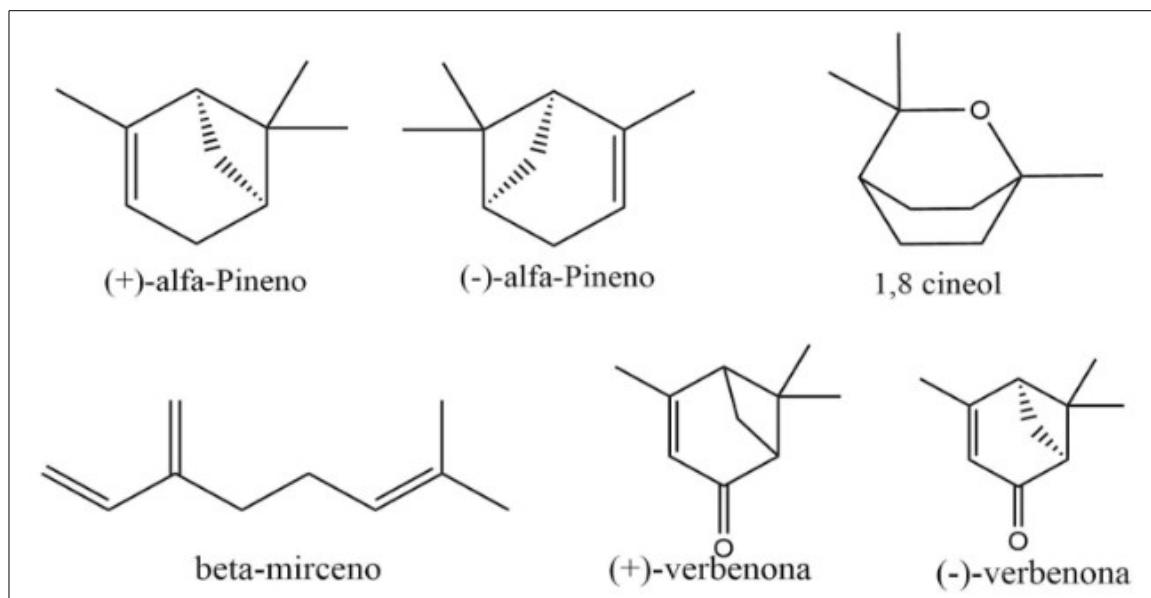


Figura 4: Estrutura molecular dos compostos que formam o óleo essencial de alecrim.

Fonte: Adaptado de Prins, Lemos e Freitas (2000).

Os óleos essenciais de alecrim podem ser classificados quanto à concentração de seus componentes principais: óleos com concentração de eucaliptol acima de 40% e óleos com concentrações aproximadamente iguais de eucaliptol, α -pineno e de cânfora, em torno de 20 a 30% (STEFFENS, 2010).

Estes óleos são usados na medicina como agentes anti-inflamatórios, antivirais e antimicrobiais. Apresentam propriedades carminativas (desintoxicam, estimulam a digestão e absorção), antioxidantes e aromáticas (STEFFENS, 2010).

Óleos essenciais extraídos de plantas têm demonstrado excelente ação antimicrobiana, inclusive interferindo no processo de formação de biofilmes. Além disso, diversos deles têm seu uso em alimentos autorizado. O óleo essencial de alecrim possui alto teor antimicrobiano, pela liberação de substâncias nocivas a estes seres, o que possibilita a adição desse óleo a filmes, aumentando a vida de prateleira do alimento a ser conservado. (STEFFENS, 2010).

7.3 Embalagens Ativas

Embalagem para alimentos, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2012) é aquele que está em contato direto com alimentos, destinado a contê-los desde a sua fabricação até a sua entrega ao consumidor, com a finalidade de protegê-los de agentes externos, de alterações e de contaminações, assim como de adulterações.

Agrega-se em filmes ou películas comestíveis, obtidos a partir de biopolímeros, diversos aditivos alimentares como conservantes, antioxidantes, aromatizantes, para melhorar a qualidade, aumentar a validade e as características sensoriais do alimento. (COMA, 2002).

Atualmente, com o aumento da tecnologia e essa busca por maior condicionamento do alimento, muitas empresas estão focadas no descobrimento de novas embalagens que possam interagir com o mesmo, aumentando e monitorando sua validade (AZEREDO, FARIA e AZEREDO, 2000) e impedindo os mecanismos de deterioração fisiológicos, biológicos (como exemplos os parasitas, mofos e bactérias), físicos (a desidratação) e químicos (a oxidação) (SANCHES, 2009).

Rooney (1992) afirma que embalagem ativa é aquela que exerce algum outro papel na preservação de alimentos em vez de ser apenas uma barreira inerte a influências externas. Para Gontard (1997), uma embalagem ativa é aquela que, além de dar proteção, também interage com o produto, em certos casos, responde a mudanças.

Convencionalmente, uma embalagem se caracteriza pelo aumento da segurança do alimento de acordo com alguns mecanismos, como: barreiras a contaminações (microbiológicas e químicas) e prevenção de migração de seus próprios componentes para o alimento. Já os sistemas de embalagens ativas, devem proporcionar funções adicionais, podendo ser destacadas: absorção de compostos que favorecem a deterioração, liberação de compostos que aumentam e monitoram a validade (HOTCHKISS, 1995).

A utilização de biopolímeros como sistema carregador de agentes antimicrobianos não é um conceito recente. Têm sido apresentadas várias abordagens e demonstrações do uso destas películas na superfície de muitos alimentos, sendo até em produtos cárneos (CUTTER, 2006). Devido sua obtenção ser a partir de materiais sustentáveis, esses novos revestimentos vem recebendo notável atenção já que saciam a demanda do consumidor com um produto sustentável (DURANGO et. al., 2006).

Segundo Cooksey (2001), os filmes antimicrobianos são diferenciados em três categorias:

- Substâncias antimicrobianas voláteis encontram-se em um sachê, sendo liberadas durante a armazenagem do produto. Podem ser utilizados materiais de embalagens comuns;
- Incorporação direta do agente antimicrobiano na película;
- A matriz do revestimento funciona como um veículo para o agente antimicrobiano.

Estas categorias são capazes de liberar o agente antimicrobiano para a superfície do alimento por meio da evaporação através do *headspace* (substâncias voláteis) ou ser transferido para dentro do alimento por meio de difusão (Figura 5).

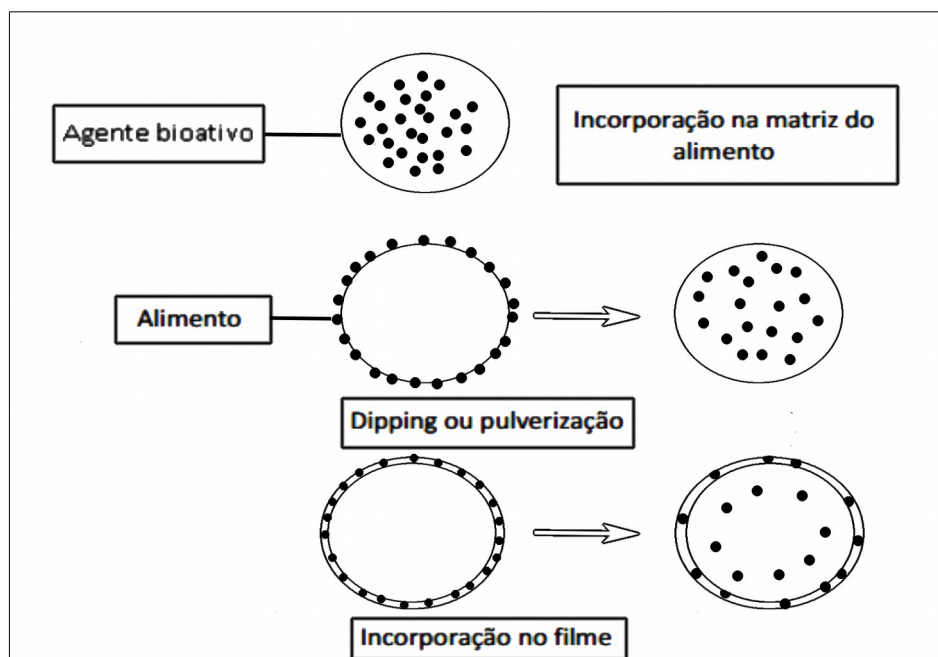


Figura 5: Diferentes modos de incorporação de aditivos nos produtos alimentares.

Fonte: Adaptado de Coma (2008).

Há uma maior eficiência neste sistema do que em uma aplicação direta no produto cárneo, já que retarda a migração do agente antimicrobiano para o interior do alimento, conservando concentrações elevadas onde é necessário.

7.3.1 Filmes de Quitosana contendo Óleo Essencial

As embalagens são essenciais para proteger o alimento. Os óleos essenciais são substâncias naturais que atualmente ganham destaque como agentes antimicrobianos associados às embalagens para alimentos. São produtos voláteis orgânicos, de origem vegetal e obtidos por processo físico (UGALDE, 2014).

Foram utilizados óleos antimicrobianos de alecrim, cravo, canela, orégano, noz-moscada, manjerição, dentre outros em filmes de acetato de celulose. Uma vez incorporados aos polímeros e em contato com o alimento, pode ocorrer uma migração lenta e constante dos agentes bactericidas e/ou bacteriostáticos, por difusão ou separação para a superfície do produto, de modo que a atividade antimicrobiana ocorra com maior intensidade onde se faz necessário (UGALDE, 2014).

Um estudo acerca do sinergismo entre a atividade antimicrobiana de três óleos essenciais (óleo de broto de cravo, óleo de canela e óleo de anis-estrelado), associado a filmes elaborados à base de quitosana, verificou que o óleo de canela teve a melhor atividade antimicrobiana quando comparado com os demais óleos analisados contra bactérias e fungos, como por exemplo: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus oryzae*, e *Penicillium digitatum*. (MONTES, SANTANA e CRUZ, 2013)

Já na utilização do filme elaborado à base de quitosana, efeitos inibidores foram visualizados apenas contra as bactérias, excetuando-se os fungos, não tendo uma notável atividade antimicrobiana (MONTES, SANTANA e CRUZ, 2013).

No entanto, o filme de quitosana contendo óleo essencial de canela apresentou um efeito melhor, pois esta associação aumentou a atividade antimicrobiana do óleo, fator que está associado à liberação constante do óleo no filme. Este estudo também mostrou que a incorporação de óleos essenciais ao filme de quitosana modificou a sua resistência mecânica, a permeabilidade ao vapor de água, ao teor de umidade e à solubilidade (MONTES, SANTANA e CRUZ, 2013).

O óleo essencial de alecrim muito se assemelha ao de canela. Segundo Machado (2010), o óleo essencial de alecrim apresentou maior inibição de bactérias em filmes ativos a base de acetato de celulose, mostrando também maior resistência na tensão em tração do filme quando utilizadas concentrações menores.

7.4 Instrumentação de análise

A fim de comprovar a eficiência dos processos anteriores, é necessário a realização de caracterizações, verificando quais foram os produtos obtidos. Por exemplo, para a quitina e quitosana é utilizado o infravermelho e para os óleos essenciais a cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (GC-MS).

7.4.1 Espectroscopia no Infravermelho

Segundo Haack (2010) a espectroscopia no infravermelho é embasada pelas vibrações dos átomos de uma molécula. Um espectro no infravermelho (região de 4000 a 400 cm^{-1}) é obtido através da passagem da radiação infravermelha no interior de uma amostra na qual é determinada a fração da radiação incidente que é absorvida em cada frequência ou comprimento de onda.

O processo normalmente apresenta uma série de bandas em vez de linhas, isso ocorre devido a cada alteração do nível de energia vibracional que é equivalente a uma série de mudanças nos níveis rotacionais. As linhas se sobrepõem expondo as bandas de vibração- rotação resultante das massas relativas dos átomos, nas constantes de força nas ligações e na geometria do composto. Cada frequência de absorção existente num espectro no infravermelho corresponde a uma frequência de vibração de uma parcela de uma molécula da amostra, e aparecem nos espectros no infravermelho em comprimento de onda (μm) ou em número de ondas (cm^{-1}), com intensidades (HAACK, 2010).

Antonino (2007) em sua tese realizou experimentos com amostras da quitina e da quitosana, sendo estas obtidas a partir da casca de crustáceos e a quitosana a partir do processo de desacetilação da quitina e, afim de caracterizar esses biopolímeros, utilizou-se de espectroscopia de infravermelho (IV). As principais bandas características dos biopolímeros quitina e quitosana, de acordo com o mesmo autor, estão de forma resumida na Tabela 1. A finalidade do uso da espectroscopia de infravermelho com a quitina e a quitosana é identificar os principais grupos funcionais pertencentes a esses biopolímeros.

Tabela 1: Principais grupos funcionais e atribuições vibracionais dos biopolímeros Quitina e Quitosana.

Amostra	Atribuição	Número de Ondas (cm-1)	Amostra	Atribuição	Número de Ondas (cm-1)
Quitina A	v (O-H)	3450	Quitina A	v (O-H)	3450
	vsim. (C-H)	2920		vsim. (C-H)	2925
	δ (C=O)	1650		δ (N-H)	1630
	vsim. (N-H)	1560		δ sim. (C-H)	1375
	δ (N-H)	1555			
	δ sim. (C-H)	1380			
Quitina B	v (O-H)	3450	Quitina B	v (O-H)	3450
	vsim. (C-H)	2920		vsim. (C-H)	2925
	δ (C=O)	1650		δ (N-H)	1654
	vsim. (N-H)	1560		δ sim. (C-H)	1380
	δ (N-H)	1555			
	δ sim. (C-H)	1380			
Quitina C	v (O-H)	3445	Quitina C	v (O-H)	3450
	vsim. (C-H)	2915		vsim. (C-H)	2900
	δ (C=O)	1655		δ (N-H)	1650
	vsim. (N-H)	1560		δ sim. (C-H)	1380
	δ (N-H)	1555			
	δ sim. (C-H)	1380			

Fonte: Antonino (2007)

7.4.2 Cromatografia Gasosa

Os óleos podem ser caracterizados através da Cromatografia Gasosa. Esta é uma técnica para análise de misturas de substâncias voláteis. A amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de um gás adequado denominado de fase móvel ou gás de arraste. Este fluxo de gás com a amostra vaporizada passa por um tubo contendo a fase estacionária (coluna cromatográfica), onde ocorre a separação da mistura. A fase estacionária pode ser um sólido adsorvente (Cromatografia Gás-Sólido) ou, mais comumente, um filme de um líquido pouco volátil, suportado sobre um sólido inerte (Cromatografia Gás-Líquido com Coluna Empacotada ou Recheada) (BAPTISTA e COSTA, 2009).

As substâncias separadas saem da coluna dissolvidas no gás de arraste e passam por um detector; dispositivo que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluído. O registro deste sinal em função do tempo é o cromatograma, sendo que as substâncias aparecem nele como picos com área proporcional a sua massa, o que possibilita a análise

quantitativa. A cromatografia gasosa é aplicável para a análise de misturas cujos constituintes tenham pontos de ebulição de até 300 °C e que sejam termicamente estáveis, que são os casos de óleos essenciais (BAPTISTA e COSTA, 2009).

Em um sistema de cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas (GC-MS) as amostras provenientes do cromatógrafo a gás, no estado gasoso, são bombardeadas por elétrons e são quebradas gerando íons positivos, negativos e radicais, e a partir da diferença entre massa/carga dos íons gerados irá separá-los. A Figura 7 apresenta um esquema da aparelhagem da Cromatografia Gasosa (BAPTISTA e COSTA, 2009).

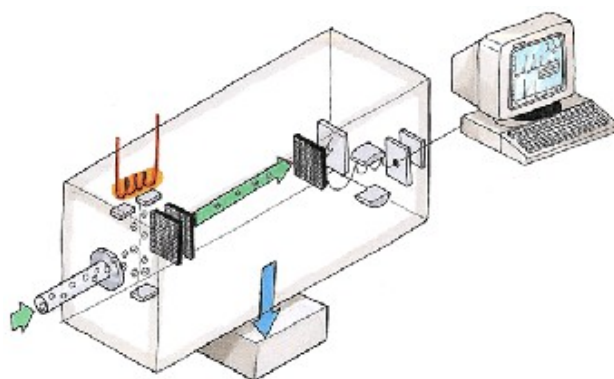


Figura 7: Esquema de um espectrômetro de massas.

Fonte: Baptista e Costa (2009).

A análise do óleo essencial de alecrim com CG-EM, segundo Ribeiro et.al (2012), apresentou ótimos resultados. Identificou-se 25 picos, porém, foi possível identificar somente 23 componentes presentes no óleo essencial de alecrim analisado. Os constituintes majoritários foram o α -pineno (19,8 %), β -mirceno (24,2 %), 1,8 cineol (22,2%) e verbenona (9,3 %), correspondendo a 75,5 % do total do óleo.

8. METODOLOGIA

8.1 Extração da quitina e produção da quitosana

O processo para obtenção da quitina e da quitosana segue as etapas de pré-tratamento, desmineralização, desproteínização e desacetilação, procedimentos propostos por Almeida et.al (2006).

Para a etapa de pré-tratamento será realizada a lavagem das cascas de camarão e siri com água destilada até os mesmos obterem pH neutro, então as cascas serão secas em estufa por 24h à temperatura de 40°C. As cascas de camarão irão ser trituradas com o uso do liquidificador e as cascas de siri serão trituradas com o auxílio de um martelo, para se obter partículas pequenas.

A desmineralização da casca será realizada em solução de ácido clorídrico HCl 1,6 M, onde 60g de casca de siri e camarão triturados será adicionada na solução ácida. Esta solução deve permanecer em agitação magnética durante 30 minutos. Após essa reação, deve ser feita a lavagem da amostra com água destilada até obtermos pH neutro e então esta solução deve ser filtrada em funil de Büchner.

Na etapa de desproteínização, deve-se adicionar uma solução de hidróxido de sódio NaOH 0,75 M, na amostra já desmineralizada, permanecendo em agitação magnética por 30 minutos e aquecimento de 70°C. Ao término da reação deve ser feita a lavagem da amostra com água destilada até se obter pH neutro e filtrá-la com funil de Büchner. No final destas três etapas obteremos a quitina que deve ser seca em estufa a 40°C por 24h.

A síntese da quitosana será realizada a partir da desacetilação de aproximadamente 50g de quitina, em solução de hidróxido de sódio NaOH 42,3%, à temperatura de 160°C, agitação de 7rpm e tempo de 60min, com sistema de refluxo e agitação magnética. No final da reação será feita a lavagem da amostra até obter-se pH neutro, e em seguida esta deve ser filtrada em funil de Büchner e seca em estufa com temperatura de 40°C por 48h.

8.1.1 Caracterização da quitina e da quitosana

A caracterização da quitina e da quitosana será realizada através do método proposto por Antonino (2007). Os espectros na região do infravermelho (IV) serão registrados em um espectrofotômetro de infravermelho na região de 400 a 4000 cm⁻¹. Os espectros de IV serão obtidos usando pastilhas preparadas a partir de amostras de quitina e quitosana, sendo que

cerca de 2,0 mg de amostra serão misturadas a 98 mg de KBr previamente seco em estufa, e esta será homogeneizada em almofariz de ágata. A mistura será prensada para formar uma pastilha de aproximadamente 0,20 mm de espessura, e em seguida será analisada.

8.2 Extração e caracterização do óleo essencial do alecrim

A extração do óleo essencial do alecrim será feita através do método de hidrodestilação, utilizando o aparelho de clevenger para o mesmo. O alecrim será submerso em água deionizada e a destilação procederá por cerca de 90 a 120 min, sendo que esse tempo de destilação favorecerá o maior rendimento da extração (PRINS, LEMOS, FREITAS, 2000).

Após feita a extração será obtida uma mistura heterogênea de óleo e água. Como a mistura possuiu duas fases, em que a de óleo essencial é menos densa que a água, pode separá-la utilizando uma pera de decantação e então obter o óleo essencial. Esse óleo será armazenado em ambiente inerte a baixas temperaturas, para que não tenha a perda de substâncias voláteis, até que seja feita sua caracterização ou uso.

Na execução do projeto será utilizada a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM). A análise qualitativa do óleo essencial será realizada dispondo de um cromatógrafo gasoso dotado com coluna capilar de sílica fundida anexada a um espectrômetro de massa. O espectro de massa será utilizado com a voltagem de ionização próxima de 70 V (temperatura da fonte 250°C).

A identificação dos compostos será realizada pela comparação de seus espectros de massa com o banco de dados da literatura. Os dados quantitativos serão obtidos das percentagens das áreas do cromatograma por meio da normalização.

8.3 Produção de biofilmes a base de quitosana e aplicação do óleo essencial de alecrim

Para a produção de biofilmes será utilizada uma adaptação da metodologia de Ugalde (2014), que se baseia na técnica de *Casting*. Esta técnica consiste na desidratação da solução coloidal, chamada de solução filmogênica (SF) na qual será produzido o biofilme sobre uma placa de Petri.

Será preparada uma solução filmogênica contendo 2 % (m/v) de quitosana, 30 % (m/m) de glicerol como agente plastificante, suspensos em uma solução de ácido acético 1 % (v/v). A solução será submetida ao processo de esterilização em autoclave à 120°C durante 10 minutos, sendo em seguida filtrada.

Após isso, a solução será resfriada até a temperatura de 40 °C para a adição do óleo essencial de alecrim 1% (v/v) e em seguida, agitado até obter-se uma mistura homogênea. Uma pequena quantidade de solução filmogênica será mantida sem o óleo essencial, para ser utilizada como um padrão inicial. Será vertida uma amostra de 90g de solução filomogênica com óleo essencial em moldes de acrílico previamente higienizados com álcool 70% (m/m), buscando a formação de filmes de espessura homogênea, e submetidas à secagem em estufa com circulação de ar à 40 °C por um período de 24 h. Após a secagem, o filme será retirado da placa e conservado em recipientes lacrados à temperatura de 4 °C para posteriormente ser analisado.

8.4 Análise das características físico-químicas dos biofilmes

8.4.1 Índice de Transparência

Na caracterização do índice de transparência, será utilizado o aparelho de medição de intensidade luminosa chamado Luxímetro (INSTRUTEMP) com capacidade de medição de 0 a 2000 lux. Segundo o site Engenharia Audiovisual (2012) Lux (lx) é a unidade de medida no SI que mede a incidência perpendicular de 1 lúmen em uma superfície de 1 metro quadrado.

Para a análise do biofilme de quitosana, será montado um trilho onde serão equipados o Luxímetro, a fonte de luz e o biofilme devidamente esticado para incidir a luz proveniente da fonte luminosa.

O índice de transparência será determinado através da comparação do valor da intensidade luminosa registrada pelo Luxímetro sem a interferência do biofilme, com a intensidade obtida com a presença do biofilme.

8.4.2 Absorção de água

O procedimento para identificar o índice de absorção de água será o mesmo proposto por Silva (2011). Primeiramente o biofilme será colocado em estufa a 105°C por 24 horas, em seguida a amostra deverá ser pesada (*mi*) e inserida em um béquer com aproximadamente 80 mL de água destilada. Serão preparadas três amostras de biofilme somente a base de quitosana e três amostras de biofilme com quitosana e óleo essencial, sendo

que ambos ficarão submersos sob agitação magnética durante 2, 6 e 24 horas, respectivamente.

Após este procedimento as amostras serão pesadas para obtenção da massa final (*mf*). Através deste método será possível determinar a perda de massa (*pm*) do material por solubilização através da equação:

$$pm = \frac{mi - mf}{mi}$$

8.4.3 Grau de Desacetilação:

O grau de desacetilação pode ser medido através da titulação potenciométrica da quitosana em que esta estará diluída em ácido clorídrico ou acético e o titulador será NaOH. Feita as titulações será calculado o grau de desacetilação da quitosana utilizando a seguinte equação:

$$\%GD = (M (V_2 - V_1) 161 \times 100) / W$$

Em que %GD é o grau desacetilação, M é a concentração de NaOH, V₂ é o volume de NaOH utilizado, V₁ é o volume de base utilizada para neutralizar o ácido do solvente, 161 é a massa de um monômero de quitosana e W é a massa de quitosana. Dessa maneira será encontrado o grau de desacetilação da quitosana.

8.4.4 Espessura

A determinação da espessura será feita utilizando um paquímetro, o filme vai ser colocado entre as esperas internas (1 e 2 da Figura 8) e então estas serão fechadas de forma que as duas partes toquem no filme, sem danificá-lo. Após esse processo a espessura será medida através da observação do nônio e da escala inferior (3 e 4 da Figura 8).

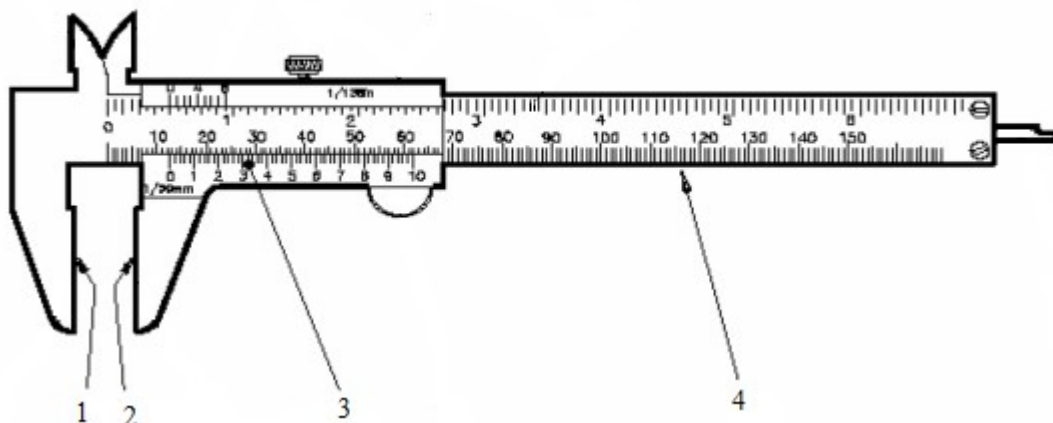


Figura 8: Elementos do paquímetro.

Fonte: Adaptado de UNIVAP, 2012.

Caso essa metodologia não seja eficiente será usado o micrometro, cuja metodologia vai ser estudada se necessário.

8.4.5 Vapor de água

A taxa de permeabilidade ao vapor de água será baseado no teste ASTM E96-80 (American Society for Testing and Material, 1989). Os biofilmes serão aplicados em células de permeação de vidro, contendo sílica gel e então colocadas em dessecadores contendo água destilada pura. As células serão pesadas diariamente, em uma balança semi-analítica durante 8-9 dias. Primeiramente será calculada a taxa de permeabilidade ao vapor de água (T_{va}), com a equação:

$$T_{va} = g/tA$$

Em que A é a área de permeação e termo g/t será calculado por regressão linear entre os pontos de ganho de peso e tempo, no regime constante. Em seguida, a permeabilidade ao vapor de água (P_{va}) será calculada utilizando-se a equação:

$$P_{va} = (g/tA)(x/\Delta P)$$

Em que x é a espessura média dos biofilmes e ΔP é a diferença de pressão de vapor do ambiente contendo sílica gel e contendo água pura.

8.5 Análise da resistência a tração do Biofilme

Para a realização dos testes de tração será utilizado um dinamômetro ligado aos filmes, que terão uma área de 2x2 cm, de forma que todos tenham o mesmo tamanho para que seja possível a comparação dos resultados. Os filmes também estarão ligados a um prato suspenso onde neste será adicionado pequenas quantidades de pesos, para assim identificar o máximo de peso que o filme consegue suportar.

Os testes serão aplicados nos filmes de quitosana sem a adição de óleo essencial, que será o branco, e nos filmes de quitosana com a presença do óleo. Esses testes serão feitos em triplicatas para diminuir o risco de erro durante o teste. Após realizados os testes poderemos comparar os dados e verificar se há uma mudança considerável quanto a resistência a tração do filme, com a adição de óleo essencial de alecrim no mesmo.

9. CRONOGRAMA

Atividade/Período	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
Extração da quitina a partir da casca de dois crustáceos (camarão e siri).	X	X			
Produção da quitosana através do processo de desacetilação da quitina.	X	X			
Caracterização da quitina e da quitosana por espectroscopia no infravermelho.	X	X			
Extração óleo essencial de alecrim por hidrodestilação.	X	X			
Caracterização do óleo essencial por meio GC-MS.	X	X			
Produção de biofilmes a base de quitosana e óleo essencial de alecrim.	X	X	X		
Análise das características físico-químicas dos biofilmes de quitosana e dos biofilmes contendo óleo essencial de alecrim.			X		
Comparação das características do biofilme a base de quitosana contendo óleo essencial de alecrim com o biofilme somente a base de quitosana.			X	X	
Redação da primeira versão do artigo.				X	
Redação da versão final.					X
Apresentação do relatório final					X

10. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Janaína. MOURA, Catarina. MUSZINSKI, Patrício. PINTO, Luiz. *Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto*. Rio Grande - RS, 2006.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL. *Standard test methods for water vapor transmission of materials: designation E 96-80*. In: *Annual book of ASTM standards*. Philadelphia, 1989. p.730-739.

ANTONINO, Nilton de Andrade. *Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira Paraibana*. João Pessoa - PB. 2007

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/embalagens.htm>>. Acesso em 10 de setembro de 2016.

ASSIS, Odilio B. G.; SILVA, Vladimir L. da. *Caracterização estrutural e da absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações*. 2003.

AZAMBUJA, Wagner. *Métodos de extração de óleos essenciais*. 2012. Disponível em: <<http://www.oleosessenciais.org/metodos-de-extracao-de-oleos-essenciais/#Hidrodestilacao>> Acesso em 07/05/2016.

AZEREDO, Henriette Monteiro Cordeiro de; FARIA, José de Assis Fonseca; AZEREDO, Alberto Monteiro Cordeiro de. *Embalagens ativas para alimentos*. Campinas , 2000.

BAPTISTA, Janinne Araújo; COSTA, Estéphane Luiza Amilar. *Cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massa*. 2009. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAa_8AI/cromatografia-gasosa-acoplada-a-espectrometria-massa> Acesso em: 24/06/2016

COMA, V. A. *Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products*. Meat Science, vol. 78, 2008.
COMA, V.; MARTIAL-GROS, A.; GARREAU, S.; COPINET, A.; SALIN, F. & DESCHAMPS, A. *Edible antimicrobial films based on chitosan matrix*. 2002

CUTTER, C.N. *Opportunities for bio-based packaging technologies to improve the quality and safety of fresh and further processed muscle foods*. Meat Science, vol. 74, 2006.

DAMIAN, César; BEIRÃO, Luiz Henrique; FRANCISCO, Alicia da; SANTO, Milton Luiz Pinho Espírito; TEIXEIRA, Evanilda. *Quitosana: Um amino polissacarídeo com características funcionais*. v.16, 2005.

DIAS, Marali Vilela. *Filmes a base de quitosana incorporados com α -tocoferol e montmorilonita para aplicação em embalagens funcional e antioxidante*. Lavras – MG. 2013

DURANGO, A.M.; SOARRES, N.F.F.; BENEVIDES, S.; TEIXERIA, J.; CARVALHO, M.; WOBETO, C.; ANDRADE, N.J. *Development and evaluation of an edible antimicrobial films based on yam starch and chitosan*. Packaging Technology & Science, 2006.

EAV - Engenharia Audiovisual. *Unidades de medida de luz*. 2012. Disponível em: <<http://www.eav.eng.br/tech/fisica/Unidadesdemedidadaluz.html>>. Acesso em 05 de julho de 2016.

GONTARD, N. Active packaging. In: SOBRAL, P.J.A.; CHUZEL, G., eds. *Workshop sobre biopolímeros*. Pirassununga, FZEA, 1997.

HAACK, M. C. *Análise de materiais por espectroscopia no infravermelho dentro do sistema de gestão de qualidade conforme ABNT NBR ISSO/IEC 17025*. 2010.

HOTCHKISS, J.H. *Safety considerations in active packaging*. Active food packaging. Glasgow: Chapman & Hall, 1995.

KOCH, Denise; LEITZKE, Marta; MONZANI, Rodrigo Martins. *Extração de óleo essencial por meio de hidrodestilação para controle de fitopatógenos*. 2011. Disponível em: <<http://eventos.ifc.edu.br/wp-content/uploads/sites/5/2014/09/CAA-13.pdf>>. Acesso em 07 de julho de 2016.

LARANJEIRA, Mauro C. M.; FÁVERE, Valfredo T. de. *Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico*. Quimica Nova, vol. 32, 672-678. 2009.

LIMA, E. C. C. B. *Utilização de quitosana no processo de clarificação do caldo de cana para fabricação do açúcar tipo mascavo*. 2005.

MACHADO, Adriane A. M. *Efeito de filme ativo incorporado com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na conservação de carne de frango resfriada*. 2010. Disponível em: <https://ppgcta.agro.ufg.br/up/71/o/Disserta%C3%A7%C3%A3o_Adriane_ago_2010.pdf>. Acesso em 08 de julho de 2016.

METAQUÍMICA. *Aparelho para determinação de Clevenger*. 2016. Disponível em: <<http://www.metaquimica.net/Produtos/Aparelho-Clevenger-108/APARELHO-PARA-DETERMINA%C3%87%C3%83O-DE-CLEVENGER--S%C3%93-A-AMPOLA-PARA-REFLUXO--369>> Acesso em: 10/072016.

MIRANDA, Cíntia Alvarenga S. F. M.; CARDOSO, Maria das Graças; BATISTA, Luís Roberto; RODRIGUES, Leonardo Milani Avelar; FIGUEIREDO, Ana Cristina da Silva. *Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas*. Fortaleza-CE, Jan-Mar, 2016.

MONTES, Simone de Souza; SANTANA, Lindanor Gomes Neta; CRUZ, Renato Souza. *Óleos essenciais em embalagens para alimentos*. Rio de Janeiro, 2013.

PAVIA, Donald D.; LAMPMAN, Gary M.; KRIZ, George S.; VYVYAN, James R. *Introdução a Espectroscopia*. 4ª ed - 2012

PRINS, C.L. LEMOS, C.S.L. FREITAS, S.P. *Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (Rosmarinus officinalis)*. Rio de Janeiro, 2000.

RIBEIRO, Daniele Silva; MELO, Daniela Benevides; GUIMARÃES, Alaíse Gil; VELOZO, Eudes Silva. *Avaliação do óleo essencial de alecrim (Rosmarinus officinalis L.) como modulador da resistência bacteriana*. Londrina – 2012.

ROONEY, M. *Reactive packaging materials for food preservation*. In: Proceedings of the First Japan-Australia Workshop on Food Processing, 1992.

SANCHES, A. R. *Embalagens ativas e inteligentes: as novas aliadas da indústria alimentícia europeia*. Disponível em: <<http://www.plastico.com.br/plastico/8324/embalagens-ativas-e-inteligentes-as-novas-aliadas-da-industria-alimenticia-europeia/>>. Acesso em 10 de maio de 2016.

SHAHIDI; ARACHCHI; JEON, ;. SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y. J. *Food applications of chitin and chitosan*. Trend is food Sci. Tech. 1999

SILVA, Elaine Cristina Gomes da. *Índice de Absorção e índice de solubilidade em água*. Teresina, 2013

SOUZA, J. R. MOURA, M. R. CORRÊA D. S. MATTOSO, L. H. C. *Obtenção e caracterização de nanopartículas poliméricas ativas contendo óleo essencial de canela*. São Paulo - 2014.

STEFFENS, Andréa Hoeltz. *Estudo da Composição Química dos Óleos Essenciais Obtidos por Destilação por Arraste a Vapor em Escala Laboratorial e Industrial*. Porto Alegre, 2010.

UGALDE, Mariane Lobo. *Biofilmes ativos com incorporação de óleos essenciais*. Erechim - RS. 2014.

Universidade do Vale do Paraíba. *Metodologia Científica: Física Experimental*. São José dos Campos - SP, 2012.