

Argus Cezar da Rocha Neto

**APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM EMBALAGENS
BIOATIVAS PARA O CONTROLE DO BOLOR AZUL
(*Penicillium expansum*) EM FRUTOS DE MAÇÃ**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Federal de Santa
Catarina para obtenção do Grau de
Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Robson Marcelo
Di Piero

Florianópolis, SC
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

da Rocha Neto, Argus Cezar
Aplicação de óleos essenciais em embalagens
bioativas para o controle do bolor azul
(*Penicillium expansum*) em frutos de maçã. / Argus
Cezar da Rocha Neto ; orientador, Robson Marcelo
Di Piero, coorientador, Marcelo Maraschin, 2018.
117 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Controle
alternativo. 3. Embalagens bioativas. 4.
Penicillium expansum. 5. Óleos essenciais. I. Di
Piero, Robson Marcelo . II. Maraschin, Marcelo.
III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências. IV. Título.

“Aplicação de óleos essenciais em embalagens bioativas para o controle do bolor azul (*Penicillium expansum*) em frutos de maçã”

Por

Argus Cezar da Rocha Neto

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (27/PPGBTC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



Prof. Dr. Mario Steindel

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



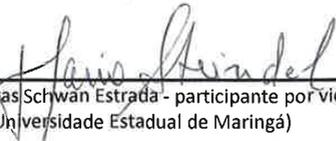
Dr. Robson Marcelo Di Piero (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador



Dr. Admir Giachini (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.ª Sandra Regina Salvador Ferreira (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.ª Kátia Regina Freitas Schwab Estrada - participante por videoconferência
(Universidade Estadual de Maringá)

Prof. Dr. Mário Steindel
Coordenador do PPG
Biotecnologia e Biociências
CCB/UFSC - Portaria nº 2157/2015/GR

Florianópolis, 02 de Março de 2018.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e sabedoria. Por me rodear de pessoas especiais, por guiar os meus passos e, principalmente, por ter dado seu filho para nos salvar. OBRIGADO SENHOR!

À Universidade Federal de Santa Catarina, e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências pelo conhecimento passado ao longo dos anos;

À CAPES pelo suporte financeiro;

Ao UNASP-EC pelo suporte financeiro e por possibilitar o desenvolvimento de parte do doutorado no exterior;

Ao professor Dr. Robson Marcelo Di Piero, pela orientação e dedicação nas diferentes etapas do trabalho, e por esses quase 8 anos de convivência e amizade. Valeu professor!

To Dr. Eva Almenar! Thank you very much for everything! For every talk we had, every suggestion, all shared knowledge! I had an amazing time at MSU, and I learned a lot from you! You are an amazing professor and an incredible researcher! Once again, thank you!

Aos membros da banca que prontamente aceitaram o convite para participar da banca examinadora, e pelas valiosas sugestões!

À minha esposa Alanny Rocha por todos os momentos de carinho, companheirismo, paciência e diversão. Obrigado por dia após dia demonstrar de alguma forma o seu amor! Obrigado por sempre estar ao meu lado, nos bons e maus momentos. Obrigado por fazer e tornar minha vida mais feliz. Obrigado por ser você! Te amo imensamente! To the moon and back!

Ao meu filho Lucca Rocha, que mesmo no auge dos seus 1 ano e 3 meses me ensina diariamente o significado das palavras paciência, compreensão, carinho e amizade. Obrigado filho por ser esse neném tão amoroso, tão sorridente, tão lindão! Por tirar a tensão dos ombros de

qualquer um com esse seu sorriso “banguela” e, principalmente, por nos ensinar diariamente o verdadeiro significado do amor. Amo MUITO você! És a razão da nossa (minha) vida!

Aos meus queridos pais, Argus Filho e Mariza Martini. Espero que vocês saibam o quanto amo vocês, de coração! Não seria hoje quem sou se não fosse pelo exemplo dado por vocês. Exemplos de vida. De trabalho. De caráter. De cristianismo. Amo muito vocês! Muito obrigado por tudo e por tanto amor pelo Lucca!

À minha querida irmã Talita (bibis). Obrigado por tudo lindona! Saiba que eu tenho um orgulho imenso de tê-la como irmã. Amo você de paixão e te admiro demais! Obrigado pelo seu apoio durante todas as fases da minha vida!

Ao meu sogro e minha sogra, Sonir e Eude Oliveira. Obrigado por todo o auxílio, carinho, amizade e, também, pelos cuidados e carinho para com o Lucca. Amo vocês!

Aos meus amigos de bancada da UFSC e da MSU, muito obrigado pelo tempo de qualidade, trocas científicas, auxílios, conversas e amizade!

Aos meus primos(as)/irmãos(ãs) Gustavo Martini de Souza, Rodrigo, Rafael, Lucas, Henrique, Jéssica e Marjorie. Amo vocês! Obrigado por tudo, desde as conversas mais sérias até as mais descontraídas. Pelo carinho incondicional e, principalmente, por me aguentarem falar tanto tempo sobre maçãs, fungos, etc!

“O temor do SENHOR é o princípio da sabedoria,
e o conhecimento do Santo é prudência.”

(Provérbios 9:10)

RESUMO

ROCHA NETO, A. C. **Aplicação de óleos essenciais em embalagens bioativas para o controle do bolor azul (*Penicillium expansum*) em frutos de maçã.** Florianópolis; 2018. [Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da UFSC].

O bolor azul causado por *P. expansum* é a principal doença no pós-colheita de maçãs, resultando na perda da qualidade e quantidade dos frutos armazenados. Os óleos essenciais (OEs) podem ser utilizados para o manejo do bolor azul desde que métodos de encapsulamento e de aplicação sejam utilizados. Este trabalho objetivou avaliar o efeito dos OEs: anis estrelado (*Illicium verum*), árvore-chá (*Melaleuca alternifolia*), e palmarosa (*Cymbopogon martinii*) no desenvolvimento do fitopatógeno e da doença, visando a proteção dos frutos de maçã cv. Fuji, além de elucidar os mecanismos de ação pelo qual os OEs atuam, e encapsular e desenvolver uma embalagem bioativa capaz de controlar o bolor azul. *In vitro*, a germinação dos esporos de *P. expansum* foi completamente inibida quando os OEs foram utilizados à concentração de 250 ppm, após 4 horas de fumigação e contato. Observou-se um aumento linear na liberação de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (ATB), e no extravasamento de DNA, glicose e proteínas solúveis g de micélio após a exposição deste por até 6 horas. Tais resultados corroboraram os obtidos por ensaios de fluorescência, onde se evidenciaram danos dos OEs associados à membrana plasmática do fungo sem, por outro lado, afetar sua parede celular ou gerar espécies reativas de oxigênio intracelulares. Quando aplicados em caixas contendo maçãs, a volatilização dos óleos essenciais não promoveu controle significativo do bolor azul. Com isto, os OEs foram encapsulados em β -ciclodextrinas (β -CD), o processo de encapsulamento otimizado visando o aumento de sua atividade antimicrobiana, e avaliada a liberação controlada dos OEs ao meio. Os complexos de inclusão (ICs) formados entre as β -CD e os OEs foram caracterizados físico-quimicamente, e a liberação dos OEs a partir das β -CD mensurada em diferentes condições de temperatura e umidade. Os ICs obtidos foram associados às embalagens feitas de PET, visando a obtenção de uma embalagem bioativa. Os ICs apresentaram alto potencial antimicrobiano, inibindo o desenvolvimento *in vitro* de colônias de *P. expansum*. Quando associados às embalagens, observou-se um atraso no crescimento e o desenvolvimento do fungo nos frutos de maçã, criando uma atmosfera inadequada pela liberação dos OEs ao ambiente, diminuindo a senescência dos frutos de maçã a partir do etileno e de sua

respiração. Nas características físico-químicas dos frutos, os OEs promoveram a manutenção da massa, dos teores de sólidos solúveis, da acidez titulável e pH, além da firmeza de polpa das maçãs, observando-se valores próximos àqueles encontrados no início do experimento ou nos frutos utilizados como testemunhas. Os resultados deste trabalho demonstram pela primeira vez a eficiência dos OEs selecionados em controlar o bolor azul, a partir de danos ocasionados à membrana plasmática, sendo capazes de promover a manutenção das características físico-químicas dos frutos. Ademais, as embalagens bioativas associadas aos ICs apresentados neste estudo demonstram a possibilidade de se utilizar comercialmente este sistema contra diversos patógenos.

Palavras-chave: β -ciclodextrinas. Anis estrelado. Complexos de inclusão. Controle alternativo. Maçã. Melaleuca. Palmarosa. *Penicillium expansum*. Óleos essenciais.

ABSTRACT

ROCHA NETO, A. C. **Application of essential oils into bioactive packages for the control of blue mold (*Penicillium expansum*) in apple fruits.** Florianópolis, 2018. [Doctoral Thesis - Graduate Program in Biotechnology and Bioscience of UFSC].

The blue mold caused by *P. expansum* is the major disease in apple's postharvest, resulting in the loss of quality, and quantity of the stored fruits. Essential oils (OEs) can be used to handle blue mold if different methods such encapsulation and different packages are used. The objective of this work was to evaluate the effects of the OEs of star anise, melaleuca and palmarosa on the development of the phytopathogen and the disease, aiming to protect the apples from cv. Fuji against the blue mold, elucidating the mechanisms of action by which OEs could act against it, and also to encapsulate and develop a bioactive package capable of controlling the blue mold. *In vitro*, the germination of *P. expansum* spores was completely inhibited when the OEs were used at 250 ppm, after 4 hours of fumigation and contact. There was an increase in the release of reactive thiobarbituric acid (ATB) species, and also the extravasation of DNA, glucose and proteins from the mycelium after the fungus was exposed to the OEs for up to 6 hours. These results corroborated those obtained by fluorescence assays, in which the OEs damage were associated with the damages on the plasma membrane of the fungus, without affecting its cell wall or generating intracellular reactive oxygen species. *In situ*, the OEs did not present relevant antimicrobial effects against the fungus. Thus, the OEs were encapsulated in β -cyclodextrins (β -CD), the encapsulation process optimized aiming to increasing their antimicrobial activity and evaluated the controlled release of OEs to the medium. The formed inclusion complexes (ICs) were physicochemical characterized, and the release of OEs from the β -CD measured under different temperature and humidity conditions. The obtained ICs were associated to the package made from PET, and a bioactive package was developed. The ICs presented high antimicrobial potential, inhibiting the development of *P. expansum* colonies *in vitro*. When the bioactive packages were used *in situ*, they delayed the growth and development of the fungus on the fruits, creating an inappropriate atmosphere by releasing the OEs to the environment, reducing the fruits senescence by decreasing the ethylene concentration and the apple's respiration. Regarding the physical-chemical characteristics of the fruits, the OEs maintained their mass, soluble

solids contents, titratable acidity and pH, besides their firmness, observing values close to those found at the beginning of the experiment or in the fruits used as control. The results of this work demonstrate for the first time the efficiency of the OEs selected in blue mold control, due to damages caused to the plasma membrane, being able to promote the maintenance of the physical-chemical characteristics of the fruits. In addition, the bioactive packages associated to ICs demonstrate the commercial usage of this system against several pathogens.

Keywords: β -cyclodextrin. Alternative control. Apple. Essential oils. Inclusion complexes. Melaleuca. Palmarosa. Star anise.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade de água (A_w) mínima necessária para o crescimento de fungos e leveduras nas diferentes famílias de alimentos.	36
Tabela 2.1 Atividade antimicrobiana da fase de vapor dos diferentes óleos essenciais (OEs) de cravo, gengibre, melaleuca, palmarosa, sálvia e anis estrelado, a 1000 ppm, bem como as concentrações mínimas necessárias (após 24h de exposição), e o tempo mínimo necessário (a 500 ppm) para completa inibição <i>in vitro</i> da germinação do fungo <i>Penicillium expansum</i>	49
Tabela 2.2 Valores relativos aos danos na membrana plasmática do fungo <i>Penicillium expansum</i> ocasionados pelos óleos essenciais (OEs) de melaleuca, palmarosa e anis estrelado (500 ppm) mensurados em unidades relativas de absorvância (iodeto de propídeo), TBARS (espécies reativas de ácido tiobarbitúrico), e extravasamento de DNA, proteínas e açúcares.	51
Tabela 4.1 Diâmetro das colônias de <i>Penicillium expansum</i> em meio de cultura (BDA), expostos às β -ciclodextrinas (β -CD), complexos de inclusão (ICs) de palmarosa (ICp) ou anis estrelado (ICsa), ou não, por até 120h, com a liberação controlada dos compostos dos óleos essenciais (OEs) de palmarosa e anis estrelado dos ICs para o <i>headspace</i> , e seus efeitos relativos ao consumo de oxigênio (O_2), e produção de dióxido de carbono (CO_2) pelo fungo.	85
Tabela 4.2 Parâmetros físico-químicos dos frutos de maçã armazenados por até 12 dias em embalagens de fundo duplo feitas de polietileno tereftalato (PET), e contendo β -ciclodextrinas (β -CD), ou complexos de inclusão (ICs) de palmarosa (ICp) ou anis estrelado (ICsa).	91

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1** Protótipo de embalagem de fundo duplo utilizada para manter a sanidade de frutos de maçã contra *Penicillium expansum*. Câmara base para deposição dos complexos de inclusão (ICs) (A), coberta por um novo fundo base (fundo duplo), contendo 90 micro perfurações para suporte das maçãs (B) no ambiente (C), selados com filme de polietileno tereftalato (PET) (D). 78
- Figura 4.2** Espectro da espectroscopia de Raman referente às β -ciclodextrinas (β -CD), complexo de inclusão de palmarosa (ICp) e do óleo essencial (OE) de palmarosa (A), e das β -CD, complexo de inclusão de anis estrelado (ICsa) e do OE de anis estrelado. 83
- Figura 4.3** Velocidade de crescimento da lesão de *Penicillium expansum* (A), e o diâmetro final da lesão (B) ocasionada pelo fungo em frutos de maçã expostas às diferentes concentrações de β -ciclodextrinas (β -CD), ou aos complexos de inclusão de palmarosa (ICp) ou anis estrelado (ICsa) (C) ao longo do período experimental de armazenamento, e os efeitos destes na síntese de etileno (D), e no consumo de dióxido de carbono (CO₂) (E), e oxigênio (O₂) (F). 88

LISTA DE TERMOS TÉCNICOS DA ÁREA E SIGLAS

- 1-MCP** – 1-MetilCicloPropeno
AC – Atmosfera Controlada
ANOVA - Análise de Variância
AT – Acidez Titulável
ATR-FTIR – Reflectância Total Atenuada de Espectroscopia de Infravermelho de Transformação de Fourier
A_w – Atividade de Água
BDA – Batata Dextrose Ágar
BRDE – Banco Regional de Desenvolvimento do Extremo Sul
CDs – Ciclodextrinas
CIs ou **IC**s – Complexos de Inclusão
CO₂ – Dióxido de Carbono
DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DSC – Calorimetria Diferencial de Varredura / *Differential Scanning Calorimetry*
DW – Massa adimensional de amostra submetida à degradação
EA – Eficiências de Aprisionamento
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO – *Food and Agriculture Organization*
FDA – *Food and Drug Administration*
FF – Firmeza do Fruto
Fingerprint – Região específica, que caracteriza uma molécula
GC-FID – Cromatografia Gasosa acoplada a um Detector de Chamas Iônico
GC/MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Massas
GRAS – Genericamente Reconhecido Como Seguro / *Generally Recognized As Safe*
Guest – Molécula ou material que foi aprisionada(o)
Headspace – Espaço vazio deixado acima de um campo ou conteúdo em um recipiente selado
Host - Molécula ou material que aprisionou o *guest*
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC_p – Complexo de Inclusão de Palmarosa
IC_s – Complexo de Inclusão de Anis Estrelado
In-Plane – No mesmo plano
ISO – *International Organization for Standardization*
MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Non-fingerprint – Região inespecífica ou não característica de uma molécula

O₂ – Oxigênio
OEs – Óleos Essenciais
OMS – Organização Mundial da Saúde
Oven – Forno do GC
PET – Polietileno Tereftalato
pH – Potencial Hidrogeniônico
PM – Perda de Massa
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio / *Reactive Oxygen Species*
Split – Porta de injeção do GC para divisão de uma molécula
Splitless – Porta de injeção do GC para manutenção de uma molécula
SST – Sólidos Solúveis Totais
TBARS – Espécies Reativas de Ácido Tiobarbitúrico / *Thiobarbituric Reactive Species*
TGA – Termogravimetria
UR – Umidade Relativa
USDA – *United States Department of Agriculture*
UV-Vis – Ultravioleta Visível
VCL – Velocidade de Crescimento da Lesão

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	9
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	23
OBJETIVOS	27
HIPÓTESES	29
CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DO PATOSSISTEMA E MEDIDAS DE CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS ...	31
1. A Cultura da Macieira	31
1.1. Aspectos históricos, botânicos e fisiológicos da maçã.....	31
1.2. Armazenamento e tecnologias pós-colheita de frutos de maçã.....	33
2. Condições do Ambiente	34
2.1. Condições dos frutos.....	34
2.1.1. Atividade de água (A_w).....	35
2.1.2. Concentração de íons de hidrogênio.....	36
2.1.3. Temperatura de processamento e armazenamento.....	37
2.1.4. Tensão gasosa.....	38
3. O Bolor Azul e Métodos de Controle Alternativo Baseados em Óleos Essenciais	39
3.1. O bolor azul: <i>Penicillium expansum</i>	39
3.2. Metabólitos secundários para o controle de doenças de plantas.....	40
3.2.1. Óleos essenciais no controle de organismos causadores de doenças de plantas.....	41
3.2.2. Encapsulamento de óleos essenciais.....	42
3.2.3. Embalagens bioativas.....	45

CAPÍTULO 2 – ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAS DE PALMAROSA (*Cymbopogon martinii*), ÁRVORE CHÁ (*Melaleuca alternifolia*) E ANIS ESTRELADO (*Illicium verum*) CONTRA *Penicillium expansum* E SEUS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO..... 47

1. Introdução.....	47
2. Material e Métodos.....	47
3. Resultados e Discussão.....	48
3.1. Fase de vapor dos óleos essenciais (OEs) e suas atividades antimicrobianas contra <i>P. expansum</i>	48
3.2. Mecanismos de ação dos OEs contra <i>P. expansum</i>	50
3.3. Efeito <i>in situ</i> do vapor dos OEs contra <i>P. expansum</i>	53
4. Conclusão.....	53

CAPÍTULO 3 – FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA DE APRISIONAMENTO DE β -CICLODEXTRINAS E SEUS EFEITOS NA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS..... 55

RESUMO..... 57

1. Resultados e Discussão.....	59
1.1. Caracterização dos óleos essenciais (OEs).....	59
1.2. Efeitos dos diferentes fatores sobre a eficiência de aprisionamento (EA) das β -CD.....	60
1.2.1. Efeitos do tipo de solvente para extração.....	60
1.2.2. Efeitos dos tipos de OEs e suas concentrações.....	61
1.2.3. Efeitos do conteúdo de água intramolecular das β -CD..	63
1.2.4. Efeitos do processo de secagem dos ICs.....	64
1.2.5. Efeitos da ordem de adição dos OEs.....	65
1.3. Caracterização térmica.....	66
1.4. Caracterização físico-química.....	68
1.4.1. Difração de Raio-X em pó.....	68

1.4.2. Reflectância total atenuada de espectroscopia de infravermelho de transformação de Fourier (ATR-FTIR).....	68
1.5. Cinética de liberação dos OEs a partir dos ICs formados.....	70
2. Conclusão.....	71
CAPÍTULO 4 – EMBALAGENS BIOATIVAS DE FUNDO DUPLO CONTENDO COMPLEXOS DE INCLUSÃO FORMADOS POR β-CICLODEXTRINAS-PALMAROSA/ANIS ESTRELADO PARA O ARMAZENAMENTO DE MAÇÃS.....	
1. Introdução.....	73
2. Material e Métodos.....	74
2.1. Materiais.....	74
2.1.1. Óleos essenciais.....	74
2.1.2. β -ciclodextrinas e demais reagentes.....	74
2.1.3. Frutos de maçã e fitopatógeno.....	75
2.2. Preparo dos complexos de inclusão, eficiência de aprisionamento e caracterização.....	75
2.3. Ensaio biológicos.....	76
2.3.1. Determinação do potencial antimicrobiano <i>in vitro</i> dos ICs contra <i>P. expansum</i>	76
2.3.2. Desenvolvimento das embalagens de fundo duplo e determinação <i>in situ</i> do seu potencial antimicrobiano contra <i>P. expansum</i>	77
2.3.3. Análises físico-químicas dos frutos de maçã.....	79
2.4. Análises estatísticas.....	80
3. Resultados e Discussão.....	80
3.1. Caracterização dos OEs.....	80
3.2. Eficiência de aprisionamento (EA) e espectroscopia de Raman.....	81

3.3. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos ICs contra o fungo <i>P. expansum</i>	84
3.4. Atividade antimicrobiana <i>in situ</i> das embalagens de fundo duplo associadas aos ICs contra o fungo <i>P. expansum</i>	86
3.4.1. Análises físico-químicas dos frutos de maçã.....	89
4. Conclusão.....	92
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

INTRODUÇÃO

Os frutos são alimentos de grande importância à saúde humana devido ao seu alto valor nutricional, sendo excelente fonte de água, vitaminas, sais minerais, fibras e compostos bioativos. Mesmo com uma crescente preocupação social acerca da saúde e bem-estar, atualmente um dos maiores desafios no âmbito das cadeias produtivas de frutos é a ampliação do consumo *per capita* da fruta *in natura* e de seus derivados. Conforme indica a Organização Mundial da Saúde, o consumo de frutos *in natura* em países em desenvolvimento como o Brasil é estimado em aproximadamente 57 kg de frutas/pessoa/ano, muito abaixo dos 146 kg de frutas/pessoa/ano recomendados pela entidade (OMS, 2015).

Mesmo com um relativo baixo consumo *per capita* de frutas no Brasil, a maçã se destaca, chegando a um consumo médio próximo aos 7 kg pessoa/ano (IBGE, 2017), correspondendo a 12,28% do total de frutos consumidos por ano pelos brasileiros. Em termos mundiais, esta cultura também se destaca, atingindo um total de 85 milhões de toneladas produzidas em 2014, em uma área de aproximadamente 5 milhões de hectares, sendo o segundo fruto mais consumido mundialmente, e crescente também o seu volume vendido aos principais centros consumidores mundiais (USDA, 2013). Neste cenário mundial de produção de frutos de maçã, de um total de noventa e cinco países produtores, vinte são responsáveis por aproximadamente 85 % da produção mundial. Nesta lista, o Brasil, que esteve na 9ª colocação em 2011, aparece atualmente na 12ª colocação (FAO, 2017), produzindo um total de 1.254.191 toneladas do fruto na safra 2016/2017, onde o estado de Santa Catarina foi responsável por 50,89% do total da produção (IBGE, 2017).

No entanto, perdas decorrentes da ação de patógenos podem ocorrer em todas as etapas da produção dos frutos de maçã, desde a colheita ao armazenamento, passando pelos processos de embalagem e distribuição (Gustavsson et al., 2011). Tais perdas poderiam ser evitadas caso os diversos procedimentos adotados fossem bem executados, diminuindo consideravelmente as perdas decorrentes por fitopatógenos, uma vez que fungos como o *Penicillium expansum* necessitam de pequenos ferimentos na epiderme dos frutos ou de aberturas naturais, como estômatos e lenticelas, para infectá-los (Filonow, 2005; Mondino et al., 2009).

Nesse sentido, *P. expansum* destaca-se como um sério problema no processo de armazenamento de maçãs, sendo um dos patógenos mais destrutivos desta cultura, capaz de esporular abundantemente e de se

disseminar rapidamente, gerando grandes perdas às indústrias de frutas frescas e processadas (Sanzani et al., 2010). O problema se agrava neste patossistema devido à produção de patulina pelo fungo, uma micotoxina com potencial cancerígeno e mutagênico, capaz de causar sérios danos à saúde humana (Rocha et al., 2014). Por tais motivos, a utilização de fungicidas sintéticos continua sendo o principal método de controle do fitopatógeno ao redor do mundo (Zhang et al., 2011), inclusive após a colheita, deixando resíduos nos frutos ou mesmo na água de lavagem das indústrias (Poulsen et al., 2009; Maxin et al., 2012). No Brasil, produtos à base de imazalil e iprodiona são registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento para o controle da doença. No entanto, sua utilização comercial não é muito disseminada, dando lugar à utilização do cloro ativo.

Com a crescente preocupação social acerca do meio ambiente e da saúde humana (Droby et al., 2009), somado às restrições impostas por países importadores (EMBRAPA, 2015), à seleção de isolados resistentes aos ingredientes ativos dos fungicidas utilizados (Weber & Palm, 2010), e também às restrições ao armazenamento dos frutos no Brasil (MAPA, 2013), novas estratégias para o controle do *P. expansum* e da manutenção da qualidade dos frutos se fazem necessárias.

Desta forma, os óleos essenciais, compostos secundários produzidos pelas plantas, demonstram-se como uma promissora alternativa, apresentando propriedades antissépticas, bactericidas, fungicidas e medicinais, sendo comumente utilizados como aditivos em alimentos, como sedativos, anti-inflamatórios, anestésicos, etc. (Bakkali et al., 2008). Além disso, são crescentes os estudos que relatam os efeitos de óleos essenciais contra diversos patógenos de pós-colheita, como *Aspergillus niger* (Stojkovic et al., 2011), *Botrytis cinerea* (Shao et al., 2013), *Colletotrichum gloeosporioides* (Sellamuthu et al., 2013), *Penicillium digitatum* (de Corato et al., 2010) e *Rhizopus stolonifer* (Shao et al., 2013).

Contudo, a tecnologia associada à utilização dos óleos essenciais para este fim tem se demonstrada limitada, ocorrendo principalmente por meio da aplicação de gotas em superfície, controlando os fitopatógenos a partir da fumigação, o que torna sua aplicação inviável financeiramente e tecnicamente, visto sua instabilidade química e rápida oxidação e volatilização. Atualmente, diversos trabalhos têm sido realizados visando transpor tais obstáculos, como o encapsulamento dos óleos essenciais ou de seus compostos em ciclodextrinas, quitosanas e lipossomos (Gong et al., 2016; Ran et al., 2016), o aprisionamento em redes poliméricas por meio de

electrospinning (Kayaci et al., 2014), e, ainda, o desenvolvimento de embalagens bioativas, com a utilização dos óleos essenciais associados ou não aos compostos anteriormente citados (Almenar et al., 2009). No entanto, até o momento, poucos trabalhos foram desenvolvidos visando a utilização dessas tecnologias para a cultura da maçã, não havendo alguma prontamente disponível aos diferentes setores da cadeia produtiva.

Nesse sentido, este trabalho buscou encapsular junto a polímeros biodegradáveis óleos essenciais que possuem propriedades antimicrobianas contra o patógeno *P. expansum*, formando complexos de inclusão com polissacarídeos que possibilitem uma gradual liberação dos compostos presentes nos óleos essenciais em protótipos de embalagens bioativas, de modo a reduzir a incidência e a severidade do bolor azul em frutos de maçã, sem alterar suas características físico-químicas.

A presente tese foi dividida em 4 capítulos, sendo 3 capítulos escritos em forma de resumos expandidos (Capítulos 2, 3 e 4) devido às questões de direitos autorais reservadas às revistas científicas, estando em consonância com a legislação vigente.

Capítulo 1 – introduz o leitor ao patossistema trabalhado, bem como às formas de controle utilizadas, às condições do ambiente necessárias ao desenvolvimento do *P. expansum*, e também às medidas de controle alternativo hoje pesquisadas.

Capítulo 2 – foi elaborado de forma resumida, contendo os resultados e discussão submetidos ao *International Journal of Food Microbiology* referentes à atividade antifúngica *in vitro* e *in situ* dos óleos essenciais de palmarosa, árvore chá e anis estrelado, bem como seus possíveis mecanismos de ação.

Capítulo 3 – foi redigido resumidamente com base nos fatores que afetam a eficiência de aprisionamento das beta(β)-ciclodextrinas (β -CD) e os seus efeitos na formação de complexos de inclusão contendo óleos essenciais, resultados previamente publicados na *Food Hydrocolloids*.

Capítulo 4 – foi escrito de forma resumida com base nos resultados obtidos pela utilização das embalagens bioativas de fundo duplo contendo complexos de inclusão formados contra o bolor azul *in situ* e *in vitro*. Os resultados deste capítulo foram submetidos à revista *Food Chemistry*.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Produzir embalagens plásticas (PET) bioativas contendo óleos essenciais micro encapsulados em beta ciclodextrinas com características antimicrobianas capazes de atuar como veículos aos óleos essenciais associados, possibilitando a liberação gradual dos compostos ao meio, visando o controle do bolor azul no pós-colheita da maçã.

Objetivos Específicos

- Selecionar diferentes óleos essenciais com atividades antimicrobianas contra *P. expansum* e determinar os mecanismos de ação envolvidos;
- Determinar a influência dos óleos essenciais selecionados sobre a severidade e incidência de *P. expansum* em frutos de maçã;
- Obter encapsulados biopoliméricos utilizando β -CD compatíveis aos óleos essenciais selecionados;
- Comparar a eficiência de encapsulamento dos diferentes óleos essenciais selecionados em β -CD em diferentes condições;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas (térmicas, morfológicas, cinética de liberação, dentre outras) dos complexos de inclusão (ICp e ICsa) obtidos;
- Produzir ao menos uma embalagem bioativa capaz de inibir o desenvolvimento de *P. expansum* em frutos de maçã;
- Determinar os parâmetros físico-químicos como acidez titulável, firmeza de polpa, perda de massa, pH e sólidos solúveis totais dos frutos armazenados em embalagens bioativas;

HIPÓTESES

- Os óleos essenciais de anis estrelado, melaleuca e palmarosa apresentam atividades antimicrobianas contra *P. expansum*, reduzindo a incidência e a severidade do bolor azul em frutos de maçã;
- Por serem sistemas complexos, devido aos seus diferentes compostos, os óleos essenciais de anis estrelado, melaleuca e palmarosa apresentam diferentes mecanismos de ação contra *P. expansum*;
- Os óleos essenciais podem ser encapsulados em β -CD de modo mais eficiente, formando complexos de inclusão com diferentes características físico-químicas;
- Podem ser desenvolvidas embalagens bioativas capazes de reduzir a incidência e a severidade do bolor azul em frutos de maçã, sem alterar as características físico-químicas dos frutos.

CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DO PATOSSISTEMA E MEDIDAS DE CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS

1. A Cultura da Macieira

1.1. Aspectos históricos, botânicos e fisiológicos da maçã

A macieira *Malus domestica* Borkh. apresenta como centro de origem a região entre o Cáucaso ao leste da China. Sua domesticação foi, possivelmente, iniciada com os gregos, sendo apenas amplamente difundida no Império Romano. Atualmente mais de 7 mil variedades de maçãs cultivadas, mas apenas cerca de 40 possuem importância econômica (Bleicher, 2002).

A macieira é uma planta da ordem Rosales, família Rosaceae e subfamília Maloideae, com cerca de 100 gêneros e mais de 2000 espécies espalhadas por todo o mundo. Esta cultura é assim caracterizada devido à presença de um receptáculo profundo em forma de taça, cujas paredes inferiores se unem aos carpelos, que por sua vez unem-se entre si. Seu fruto é caracterizado botanicamente como um pomo, sendo constituído por um receptáculo carnudo e desenvolvido que envolve os ovários do endocarpo coriáceo, com uma única semente. As árvores são lenhosas, adaptadas ao clima temperado, de folhas simples, alternadas e caducas, com flores hermafroditas de cores brancas ou rosas (Luchi, 2002).

Comercialmente para o cultivo da macieira diversos fatores devem ser levados em consideração, tais como temperatura, umidade relativa, vento, pluviosidade, insolação, tipos de solo, topografia, entre outros. Dentre eles, a temperatura é o fator mais relevante, não apenas por influenciar diretamente no período de dormência da planta, mas também na fase do seu crescimento vegetativo. Assim, as temperaturas de inverno, primavera e verão são de extrema importância, já que influenciarão diretamente o desenvolvimento da cultura. Com isto, sabe-se que temperaturas próximas aos 20 °C durante o período vegetativo são indispensáveis ao estabelecimento de ciclo normal das plantas. No entanto, quando não há frio suficiente para o processo de quebra de dormência nas plantas, a concentração dos inibidores de crescimento é mantida e a frutificação ocorre de modo desuniforme, havendo a necessidade do uso complementar de métodos artificiais, como a utilização de óleo mineral associado a cianamida hidrogenada (Petri, 2002).

Em termos de produção mundial, a cultura da macieira se destaca, sendo o segundo fruto mais produzido e consumido ao redor do globo, atingindo um total de 85 milhões de toneladas produzidas em 2014, em uma área de aproximadamente 5 milhões de hectares, sendo crescente o seu volume vendido aos principais centros consumidores mundiais. No cenário mundial de produção de frutos de maçã, de um total de noventa e cinco países produtores, vinte são responsáveis por aproximadamente 85 % da produção mundial. Nesta lista, o Brasil que esteve na 9ª colocação em 2011, aparece atualmente na 12ª colocação (FAO, 2017).

Durante muito tempo, o consumo de maçãs no Brasil se deu a partir da importação dos frutos de países de clima temperado, como a Argentina e Uruguai, onde em meados da década de 1960 o país era um dos principais importadores do fruto no mundo (FAO, 2007). Impulsionado pelo consumo nacional, a produção interna dos frutos passou a crescer, diminuindo gradativamente as importações do fruto. Em 2003, o Brasil alcançou seu primeiro saldo positivo no comércio internacional de maçãs, colocando no mercado frutos a preços competitivos (MAPA, 2013).

Em 2012, o Brasil produziu aproximadamente 1,3 milhões de toneladas do fruto, com um valor estimado calculado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística de R\$ 851,7 milhões (IBGE, 2017), gerando aproximadamente 60 mil empregos diretos e 140 mil empregos indiretos pela natureza da atividade, com intensa utilização de mão-de-obra (BRDE, 2011). Atualmente, esta quantia é obtida em uma área reduzida, indicando um aumento da produtividade, sendo produzidos um total de 1.254.191 toneladas do fruto na safra 2016/2017, com o estado de Santa Catarina correspondendo por mais de 50% do total da produção (IBGE, 2017).

Dentre as principais cultivares produzidas no Brasil, Fuji e Gala se destacam, onde aproximadamente 55% das maçãs produzidas no Brasil são da cultivar Gala, e 40% da cultivar Fuji (MAPA, 2013). A Gala é uma das cultivares que mais vem crescendo em popularidade no mundo, devido a sua alta qualidade gustativa e boa aparência dos frutos. É uma cultivar precoce, com início da colheita na região sul do Brasil entre janeiro e fevereiro. Seus frutos são lisos e brilhantes, com tamanho médio a pequeno com formato cônico, polpa suculenta e crocante, possuindo uma coloração vermelho-rajado sob fundo amarelo. É uma cultivar muito suscetível à sarna causada por *Venturia inaequalis*,

podridão amarga causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, e também ao bolor azul causado por *P. expansum* (Camilo & Denardi, 2002).

Por sua vez, a cultivar Fuji, atualmente considerada como uma das quatro cultivares mais promissoras no contexto mundial devido ao seu sabor, acidez, teor de açúcares e firmeza, além de alta produtividade, representa cerca de 40% do volume total de vendas de frutos de maçã no mercado internacional (USDA, 2013). As plantas desta cultivar apresentam grande vigor e alta produtividade, sendo uma cultivar tardia quando comparada a cultivar Gala, com a colheita ocorrendo entre março e abril na região sul do Brasil. Seus frutos são arredondados a oblongos, sua epiderme é fina, de coloração rosa, com cor de fundo amarelada quando próximo ao ponto de maturação, sendo de tamanho médio a grande. A polpa dos frutos desta cultivar são fortemente aromáticas, de textura firme, crocante e suculenta. Tal qual a cultivar Gala, também é suscetível à podridão amarga e ao bolor azul (Camilo & Denardi, 2002).

Em ambas cultivares a velocidade de crescimento, forma e tamanho dos frutos, tempo e homogeneidade de maturação irá variar de acordo com o local em que o pomar será estabelecido. Além disso, como em outros frutos climatéricos após a colheita, quando armazenados em temperatura ambiente, a maçã apresenta um rápido aumento de sua taxa respiratória e síntese de etileno, culminando no aceleração de sua maturação fisiológica (Kader, 1992).

1.2. Armazenamento e tecnologias pós-colheita de frutos de maçã

Visando diminuir a taxa respiratória e a síntese de etileno dos frutos de maçã, e deste modo garantir o abastecimento do mercado consumidor ao longo do ano, hajam vistos os períodos de colheita dos frutos supracitados, a estocagem dos frutos de maçã em câmaras frias, com temperaturas próximas a 2 °C é de extrema importância. Neste contexto, frutos da cultivar Gala podem ser conservados por até 3 meses em tais condições, sem perder seu sabor e textura, estendendo-se por até 5 meses quando utilizada condições de atmosfera controlada. Semelhantemente, frutos da cultivar Fuji também podem ser conservados sem a perda de suas características físico-químicas em câmaras frias ou de atmosfera controlada durante 6 ou 12 meses, respectivamente (MAPA, 2013).

No entanto, as atuais tecnologias pós-colheita disponíveis no Brasil permitem o correto armazenamento de aproximadamente 65% do total da safra de maçãs produzidas, por 8 a 10 meses (MAPA, 2013).

Deste potencial de armazenamento, 50% está concentrado no estado de Santa Catarina, dividindo-se em: casas de embalagem de pequeno porte (24%); médio porte (54%); e grande porte (22%) (BRDE, 2011). Tais valores indicam que apenas 815.224 toneladas do fruto são armazenadas corretamente, perdendo-se 438.967 toneladas do fruto (quando não prontamente comercializados).

Considerando-se apenas o estado de Santa Catarina, com uma produção total de aproximadamente 627.096 toneladas do fruto na safra 2016/17, cerca de apenas 203.806 toneladas do fruto foram corretamente armazenados por casas de embalagem de pequeno (48.914), médio (110.054) e grande porte (44.838). Além disso, há de se considerar que o estado tem a produção de maçãs, em sua maioria, realizada por produtores de pequeno porte, vinculados a cooperativas (BRDE, 2011), o que impede a correta destinação dos frutos em momentos de grande aporte de frutos (pico da safra), promovendo perdas no processo de pós-colheita e deixando os produtores à margem dos valores pagos pelas casas de embalagem. Somado a isso, o transporte inadequado dos frutos das casas de embalagem aos centros de distribuição dos frutos (supermercados e feiras), muitas vezes realizado sem refrigeração, favorece as perdas dos frutos, limitando o deslocamento por grandes distâncias. Além disso, muitos dos grandes centros de distribuição não possuem condições adequadas para o armazenamento dos frutos, tornando o produto mais oneroso e menos atrativo ao consumo.

Por sua vez, mesmo frutos colhidos e corretamente armazenados estão sujeitos ao ataque de microrganismos agressivos e produtores de enzimas pectinolíticas que resultam na destruição tecidual (Vilanova et al., 2014a). Somado a isto, danos mecânicos ocasionados durante o manuseio dos frutos na colheita ou em pós-colheita que dificilmente são eliminados, devido principalmente à falta de capacitação da mão-de-obra, se refletem no desenvolvimento de diferentes podridões (Vilanova et al., 2014b), mesmo quando armazenados sob baixas temperaturas, que retardam, mas não impedem o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos (Buron-Moles et al., 2012).

2. Condições do Ambiente

2.1. Condições dos frutos

Assim como todos os alimentos, os frutos de maçã são altamente nutritivos, sendo ambientes ricos para o aparecimento de doenças. Deste modo, quando os frutos de maçã adquirem adequadas condições físico-químicas, apenas organismos fastidiosos e não específicos não irão se desenvolver, visto que os mecanismos de defesa inerentes perdem sua eficiência após sua completa maturação. Em adição, observa-se ainda um aumento do pH do tecido, o amolecimento dos tecidos, aumento dos açúcares disponíveis, o que favorece o aparecimento dos fitopatógenos (Pitt & Hocking, 2013).

Outros fatores podem ainda afetar o aparecimento e desenvolvimento de podridões em alimentos, a saber: (1) atividade de água; (2) concentração de íons de hidrogênio; (3) temperatura de processamento e armazenamento; (4) tensão gasosa, principalmente de oxigênio e dióxido de carbono, dentre outros (Pitt & Hocking, 2013).

2.1.1. Atividade de água (A_w)

Todos os alimentos possuem água em sua constituição em maiores ou menores quantidades, observando-se uma relação diretamente proporcional definida por: quanto maior a quantidade de água em um alimento, mais rápida sua deterioração frente aos diferentes processos químicos e, principalmente, ação microbiológica. Em relação a isto, dentre os diferentes parâmetros levados em consideração, como o conteúdo de água, concentração de soluto, pressão osmótica, equilíbrio de umidade relativa e atividade de água, o de maior relevância para o crescimento microbiano e atividade enzimática é classificado como atividade de água (Troller, 1978).

A atividade de água (a_w) pode ser entendida como a disponibilidade de água existente em um determinado alimento, em um momento de equilíbrio onde a umidade relativa permanece estática, isto é, o alimento não perde ou recebe água do ambiente. Em termos numéricos, assume-se o valor de $a_w = 1,0$ para água pura, e de $a_w = 0$ para uma superfície sem presença de água (Sela & Fallik, 2009). Nesse sentido, a a_w pode afetar diretamente os diferentes ciclos de crescimento microbiano, afetando desde a germinação, passando pelo processo de colonização dos tecidos até sua morte (Troller, 1978).

Diante disto, o conhecimento das relações entre o patógeno e a a_w pode auxiliar a prever tanto o potencial para infecção quanto o tempo de prateleira do produto. Mais especificamente, sabe-se que alguns fungos são capazes de crescer em uma baixa atividade de água ($a_w = 0,61$), mesmo na presença de grandes quantidades de soluto (Tabela 1). Assim, frutos de maçã, que naturalmente possuem uma alta a_w , são considerados ambientes adequados para o crescimento e proliferação de fungos como *P. expansum* (Sela & Fallik, 2009).

Tabela 1. Atividade de água (A_w) mínima necessária para o crescimento de fungos e leveduras nas diferentes famílias de alimentos.

Atividade de água (A_w)	Microrganismos		Famílias de Alimentos
	Fungos	Leveduras	
0,97	-	-	Carnes frescas, frutas e vegetais
0,95	-	-	
0,94	<i>Stachybotrys chartarum</i>	-	Queijos, carnes curadas, produtos de panificação
0,93	<i>Rhizopus nigricans</i>	-	
0,92	-	-	
0,91	-	-	
0,90	<i>Trichothecium roseum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
0,88	-	<i>Candida sp.</i>	Queijos curados, carnes secas, sucos de frutas concentrado, alimentos processados (leite condensado, creme de leite, etc)
0,87	-	-	
0,85	<i>Aspergillus clavatus</i>	-	
0,84	<i>Byssochamys nivea</i>	-	
0,83	<i>Penicillium expansum</i> ; (+)	<i>Debaryomyces hansenii</i>	
0,82	<i>Aspergillus parasiticus</i> ; (+)	-	
0,81	<i>Penicillium cyclopium</i> ; (+)	-	
0,80	-	<i>Saccharomyces bailii</i>	
0,79	<i>Penicillium martensii</i>	-	
0,78	<i>Aspergillus flavus</i>	-	Geléias, marmeladas, frutas secas, carnes salgadas
0,77	<i>Aspergillus niger</i> ; (+)	-	
0,75	<i>Aspergillus candidus</i> ; (+)	-	
0,71	<i>Eurotium chevalieri</i>	-	
0,70	<i>Eurotium amstelodami</i>	-	Frutas secas, alimentos utilizados na ração de animais
0,62	-	<i>Saccharomyces rouxii</i>	
0,61	<i>Monascus bisporus</i>	-	
0,60	Sem proliferação microbiana		

Legenda: (+) indica a existência de outros microrganismos para determinada faixa de A_w , à saber: 0,83 – *P. islandicum* e *P. viridicatum*; 0,82 – *A. fumigatus*; 0,81 – *P. patulum*; 0,77 – *A. ochraceus*; 0,75 – *A. restrictus*.

2.1.2. Concentração de íons de hidrogênio

Outro parâmetro de grande importância e influência no desenvolvimento microbiano é a concentração de íons de hidrogênio no meio, ou simplesmente pH. Ao passo que a maioria das bactérias necessitam de pH próximo ao neutro, tendendo ao básico (6,5 – 7,5), a maioria dos fungos e leveduras podem crescer e se desenvolver em diferentes gamas de pH (3 – 8). Deste modo, uma vez que frutos como a

maçã possuem pH na faixa entre 3,5 – 4,5, dependendo da cultivar, haverá naturalmente uma predominância no crescimento e desenvolvimento de fungos (Sela & Fallik, 2009).

Em relação a *P. expansum*, um fitopatógeno ácido, demonstrou-se que isolados capazes de sintetizar grande quantidade da enzima glucose oxidase, são capazes de secretar grandes quantidades do ácido glucônico, além do ácido cítrico, tendo uma maior capacidade de causar podridões em maçãs, por diminuir o pH dos tecidos dos frutos, aumentando o aporte de nutrientes disponíveis ao seu consumo. Por outro lado, em isolados de *P. expansum* cuja síntese da enzima glucose oxidase é baixa, há diminuição da secreção de ácido glucônico e, por consequência, uma moderada acidificação do meio, o que resulta em um menor desenvolvimento do patógeno (Prusky & Lichter, 2008).

2.1.3. Temperatura de processamento e armazenamento

Conforme abordado anteriormente (item 1.2), um dos fatores de maior influência no tempo de prateleira dos frutos de maçã é a temperatura, onde parte dos frutos de maçã são armazenados em baixas temperaturas, entre 0 a 3 °C. Deste modo, há uma diminuição nos processos fisiológicos do fruto, resultando na manutenção da firmeza da polpa, do índice de sólidos solúveis totais, dentre outros parâmetros. Por outro lado, sabe-se que quanto maior o tempo em que os frutos de maçã passam sem refrigeração, mais rapidamente ocorrerá sua degradação, de forma irreversível (Johnston et al., 2002). Além disso, o armazenamento em baixas temperaturas também pode contribuir para diminuir a produção de etileno durante o período de armazenamento, quando comparado à temperatura ambiente (Bekele et al., 2016).

A temperatura na qual os frutos serão processados e armazenados representa um papel chave no crescimento e desenvolvimento de fungos (Gunderson et al., 2009). Neste sentido, pode-se dividir os microrganismos em diferentes classificações quanto à sua capacidade de crescimento nas diferentes faixas de temperatura. De interesse para a cultura da maçã destacam-se os psicrófilos, microrganismos capazes de crescer, se desenvolver e se multiplicar em baixas temperaturas, com uma faixa ótima de crescimento e multiplicação entre 8 – 20 °C, ao passo que os mesófilos são capazes de crescer, desenvolver-se e multiplicar em temperaturas moderadas, com uma faixa ótima de crescimento entre 30 – 40 °C (Sela & Fallik, 2009).

Faz-se importante destacar, no entanto, que microrganismos mesófilos são capazes de sobreviver em baixas temperaturas, ao passo que psicrófilos são capazes de crescer e se multiplicar em temperatura ambiente moderada (Sela & Fallik, 2009).

Nesse sentido, o fungo *P. expansum* é classificado como um fungo psicrófilo, capaz de crescer nas baixas temperaturas em que os frutos de maçã são armazenados (0 a 3 °C), com uma temperatura ótima de crescimento próxima dos 25 °C (Baert et al., 2007), o que demonstra a importância do rápido armazenamento dos frutos em baixas temperaturas.

2.1.4. Tensão gasosa

A tensão gasosa refere-se às quantidades existentes de um determinado gás em relação ao ambiente. Tal conceito é muito aplicado e conhecido em termos de atmosfera controlada (AC), muito difundida por aumentar o período de armazenamento de alimentos sazonais, como maçãs, peras, entre outros frutos, por meio da manutenção de baixos níveis de O₂ e relativo aumento dos níveis de CO₂ em câmaras devidamente vedadas (Fallik, 2008).

De modo mais específico para a cultura da maçã, a AC é utilizada em conjunto com baixas temperaturas, prolongando ainda mais o período de armazenamento, diminuindo a respiração dos frutos, a síntese de etileno e todos os processos bioquímicos e fisiológicos associados (Bekele et al., 2016). Além disso, diversos parâmetros devem ser levados em consideração antes do armazenamento em AC, uma vez que a tolerância dos frutos de maçã depende da cultivar em questão, ponto de maturidade, concentrações de CO₂ e O₂ utilizados, e período de armazenamento (DeEll et al., 2016).

Sabe-se também que fungos causadores de bolores, assim como diversos outros fungos filamentosos, necessitam de oxigênio para seu crescimento e desenvolvimento. No entanto, algumas espécies são mais adaptadas que outras, utilizando o oxigênio disponível de forma mais eficiente. Deste modo, a quantidade total de oxigênio disponível, difundido no meio, é mais determinante para o crescimento e desenvolvimento do que a tensão de oxigênio presente no ambiente (Pitt & Hocking, 2013).

Assim, o efeito da AC no crescimento e desenvolvimento do bolor azul causado por *P. expansum* será variável e altamente dependente da temperatura, onde quanto menor a temperatura utilizada,

maior a eficiência da câmara de AC (Conway et al., 2007). Tal relação foi determinada a cerca de 40 anos atrás, em trabalho publicado por Borecka (1976), que demonstrou que o crescimento de *P. expansum* em frutos de maçã foi retardado quando utilizada a combinação de armazenamento a 4 °C, e 3 kPa de O₂ e 5 kPa de CO₂, e sem sofrer influência quando utilizada a combinação de 4 °C, e 3 kPa de O₂ e 0 kPa de CO₂. Em um trabalho publicado por Sams & Conway (1987), concentrações de O₂ de 3 kPa ou 1 kPa, e 2 kPa ou 0 kPa de CO₂, combinado a uma menor temperatura (0 °C), resultaram num menor desenvolvimento de *P. expansum* em frutos de maçã.

3. O Bolor Azul e Métodos de Controle Alternativo Baseados em Óleos Essenciais

3.1. O bolor azul: Penicillium expansum

O gênero *Penicillium*, pertencente ao filo Ascomycota, ordem Eurotiales, e família Trichocomaceae, possui inúmeras espécies comuns na fase de pós-colheita de frutos, onde algumas podem produzir micotoxinas nos órgãos atacados, como a patulina, um composto polar produzido por todos os isolados de *P. expansum* (Frisvad & Samson, 2004; Sanzani et al., 2009; Kozlovskii et al., 2013; Pitt & Hocking, 2013). *P. expansum* é um fungo de ocorrência mundial, que pode atacar diversas culturas quando em condições adequadas, tais como maçãs e peras, provocando uma podridão de caráter mole, sendo considerado a doença mais importante no pós-colheita de maçãs em função das perdas qualitativas e quantitativas dos frutos armazenados (Janisiewicz & Korsten, 2002), não havendo, até o momento, cultivares comerciais resistentes ao ataque do fitopatógeno.

A podridão mole causada pelo fungo apresenta aspecto aquoso, com coloração castanho-claro, podendo variar em tonalidade de uma fruta atacada a outra, e onde a área tecidual afetada separa-se facilmente das partes sadias. A esporulação do fitopatógeno é abundante nas regiões infectadas, apresentando inicialmente uma coloração esbranquiçada (esporos imaturos) e, com o progresso da doença, adquirindo coloração azulada (esporos maduros) nos frutos de maçã, o que dá o nome popular da doença (bolor azul). Por ser incapaz de atravessar a cutícula dos frutos, a penetração do fungo ocorre a partir de ferimentos ou de aberturas naturais, onde cada fruto contaminado é

capaz de infectar de 12 a 15 novos frutos sadios (Kimati et al., 1997; Mondino et al., 2009).

No Brasil, os tratamentos pós-colheita para o controle dessa patologia podem ser realizados com fungicidas registrados no MAPA, pertencentes aos grupamentos químicos dicarboximida e imidazol, com os princípios ativos iprodiona e imazalil, respectivamente. Para a utilização destes, a água do tratamento deve estar isenta de partículas de argila e matéria orgânica (MAPA, 2013). Os dois fungicidas apresentam classificação toxicológica I (extremamente tóxicos) e ambiental II (produto muito perigoso ao meio ambiente).

3.2. *Metabólitos secundários para o controle de doenças de plantas*

Diversas são as pesquisas que têm sido realizadas com substâncias alternativas à utilização de fungicidas em sistemas vegetais, do campo ao pós-colheita, de modo a se reduzir os potenciais danos à saúde humana e ao meio ambiente, estando de acordo com a crescente demanda social por alimentos saudáveis, produzidos sem a utilização de agrotóxicos.

Neste cenário, os metabólitos produzidos por plantas condimentares e aromáticas apresentam-se como uma alternativa promissora, visto a diversidade de classes de compostos que são produzidos tanto no seu desenvolvimento, quanto em resposta a algum estresse ou ataque de fitopatógenos (Cabral et al., 2013). Além disso, de um modo geral, diversos metabólitos são considerados e classificados como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*), um dos órgãos regulatórios de maior prestígio internacional, devido à sua fácil decomposição e baixa toxidez ambiental e humana. Cabe ressaltar que tal classificação decorre ainda de outros fatores como a composição dos óleos essenciais, bem como a concentração em que estes são utilizados, seja de forma utópica ou mesmo ingeridos.

O potencial dos metabólitos produzidos por plantas em inibir o crescimento de fitopatógenos está diretamente associado à forma em que os extratos são preparados, levando-se em conta, principalmente, os solventes empregados, onde solventes polares, devido à sua alta capacidade de penetração tecidual são mais eficientes na extração de uma gama de compostos quando comparados aos solventes apolares (Mahlo et al., 2010).

Dentre as principais classes de compostos metabólicos produzidos pelas plantas, podem-se destacar os alcaloides, carotenoides, compostos fenólicos, flavonóides, terpenos, dentre outros.

3.2.1. Óleos essenciais no controle de organismos causadores de doenças em plantas

Os óleos essenciais (OEs) são compostos oleosos, de caráter lipofílico e altamente voláteis, produzidos pelo metabolismo secundário de plantas, com massa molar menor que 300 g/mol, o que possibilita sua separação de outros compostos ou tecidos por meio de processos com vapor, hidro destilação, prensagem a frio ou mesmo extração supercrítica, sendo classificados como *GRAS* pelo FDA (Bakkali et al., 2008; Turek & Stintzing, 2013). Deste modo, por definição, o termo OEs foi atribuído pela Organização Internacional para Padronização a “produtos obtidos a partir de material vegetal bruto por meio de destilação ou por vapor de água, ou do epicarpo de frutos cítricos por processos mecânicos ou destilação seca” (ISO 9235, 1997).

Apesar de diversos temperos provenientes de plantas terem sido utilizados desde a antiguidade devido às suas propriedades aromáticas, saborizantes e preservativas, os OEs extraídos por meio da destilação apenas foram utilizados de modo farmacológico próximo ao século 13, sendo espalhados pelo continente europeu apenas no século 16, com o primeiro experimento exploratório do seu potencial bactericida (por meio do vapor) ocorrendo no século 18. Atualmente, cerca de 3000 OEs são conhecidos, mas apenas cerca de 10% são comercializados, principalmente destinados à gastronomia, devido aos seus sabores, ou à indústria farmacêutica/cosmética, devido ao seu aroma (Burt, 2004).

Sua atividade antimicrobiana inerente é comumente relacionada à estrutura química dos seus componentes, suas interações e à concentração em que estão presentes. Por serem constituídos de uma grande variedade de compostos, como terpenos, terpenóides e compostos aromáticos, apresentam a vantagem de atuarem de diferentes formas, possibilitando o controle de fungos de diversos gêneros e diminuindo a probabilidade de seleção de isolados patogênicos resistentes (Cabral et al., 2013). Ressalta-se, no entanto, que mesmo apresentando uma grande variedade de compostos em sua constituição (20 – 60), apenas cerca de 3 – 4 são tidos como majoritários, constituindo cerca de 20 – 80% de um OE (Bakkali et al., 2008).

Diversos são os estudos que demonstram o potencial antimicrobiano dos OEs contra uma vasta gama de fitopatógenos em pós-colheita, como, por exemplo, a utilização de *Calamintha officinalis*, *Lavandula dentata*, *Mentha pulegium*, *Origanum compactum*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia aegyptiaca* e *Thymus glandulosus* contra *Botrytis cinerea* (Bouchra et al., 2003), *Carum nigrum* contra *Aspergillus flavus* e *A. niger* (Singh et al., 2006), *Vitex agnus-castus* contra *Alternaria alternata*, *A. flavus*, *A. niger* e *A. ochraceus* (Stojković et al., 2011).

Em relação ao gênero *Penicillium*, Singh et al. (2006) usando o óleo essencial de anis estrelado e seu extrato acetônico, observaram uma inibição do crescimento micelial *in vitro* de *P. citrinum* e *P. viridicatum* próximo a 40%, utilizando 6 µL do óleo essencial de anis estrelado, e em até 75% quando utilizado o extrato acetônico. Além disso, Stojković et al. (2011) observaram a completa inibição do crescimento *in vitro* de *P. ochrochloron* e de *P. funiculosum* utilizando o óleo essencial extraído de frutos verdes, maduros e de folhas de *V. agnus-castus* à concentração de 130, 219 e 178 ppm, respectivamente, para *P. ochrochloron* e de 178 ppm para *P. funiculosum*. Por outro lado, ao utilizar o óleo de *Tamarix in vitro* nas concentrações de 80, 200 e 500 µL por disco de papel filtro Saidana et al. (2008) não encontraram nenhuma atividade antifúngica contra o fungo *Penicillium sp.*

Poucos são os trabalhos publicados especificamente em relação a *P. expansum*, e ainda mais escassos são aqueles que abordam os mecanismos de ação envolvidos. Em um estudo utilizando os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* e *Thymus vulgaris*, e também suas diferentes frações, Nguefack et al. (2012) demonstraram diferentes níveis de atividade antimicrobiana *in vitro* contra o fitopatógeno, utilizando uma concentração de 1000 ppm. De modo semelhante, Frankova et al. (2016) utilizando os óleos essenciais de *Caryophyllus aromaticus*, *Cinnamomum zeylanicum*, *C. citratus* e *Origanum vulgare* a partir do método de volatilização em disco, observaram a completa inibição *in vitro* de *P. expansum* utilizando as doses de 256 ppm, 32 ppm, 512 ppm e 64 ppm, respectivamente. No entanto, quando utilizados para o controle do bolor azul em frutos de maçã, uma alta incidência da doença foi observada, independente do óleo essencial utilizado, da dose ou mesmo do intervalo de armazenamento.

3.2.2. Encapsulamento de óleos essenciais

Antes de serem extraídos, os diferentes compostos coexistentes dentro de mesmo óleo essencial, pertencentes ou não a um mesmo grupo, devido às suas interações estruturais intrínsecas, podem ser facilmente convertidos em outros compostos ou produtos a partir de sua oxidação, isomerização cíclica ou reações de desidrogenação, desencadeados a partir de processos físicos, químicos ou mesmo enzimáticos (Turek & Stintzing, 2013).

Uma vez desprovidos da compartimentalização protetora antes existente na planta, os óleos essenciais podem ser mais facilmente degradados a partir da oxidação, transformações químicas e reações de polimerização, afetando os diversos óleos essenciais de uma forma mais ou menos pronunciada (Kubeczka, 1993).

Assim, a degradação dos óleos essenciais irá depender de uma série de fatores químicos e edáficos que afetarão os processos de oxidação, bem como o curso da reação. Deste modo, fatores externos como temperatura, luz e acesso ao oxigênio atmosférico, e fatores intrínsecos como composição dos óleos essenciais, suas diferentes estruturas, e a presença de impurezas como, por exemplo, vestígios de solventes, são de extrema importância nos processos supracitados (Turek & Stintzing, 2013).

De modo a se manter a atividade biológica dos óleos essenciais, suas moléculas precisam chegar ao destino final sem perder sua integridade. Neste cenário, o encapsulamento dos óleos essenciais em polissacarídeos surge como uma alternativa viável à sua utilização (Fathi et al., 2014; Pinho et al., 2014).

Os polissacarídeos são polímeros naturais formados a partir de monossacarídeos que irão variar em tipo, número, distribuição e ligação dos monômeros dentro das cadeias formadas (Bochkov et al., 1991). Estes compostos têm atraído grande interesse nos últimos anos não apenas por serem seguros à utilização, devido à baixa toxicidade ambiental e ao ser humano, como por apresentar um baixo custo relativo, sendo dessa forma utilizados nos mais diversos sistemas. De acordo com Eliasson (2006), polissacarídeos podem ser categorizados de acordo com sua origem: vegetal (amido, celulose, pectina e algumas gomas); animal (quitosana); algal (alginato e carragenanas); e, derivadas de microrganismos (xantana, quitosana) ou que sofreram algum processo relacionado a estes (dextrinas e ciclodextrinas).

De interesse para o presente estudo destacam-se as ciclodextrinas (CDs), uma família de oligossacarídeos cíclicos derivados dos amidos a partir da ação da enzima amilase ciclodextrina glicosil transferase, formados a partir de 6, 7 ou 8 unidades de α -D-glicopirranose unidas por ligações do tipo α -1,4 (Almenar et al., 2007; Fathi et al., 2014). A forma cônica das CDs confere a elas uma cavidade central lipofílica e um exterior hidrofílico, com uma profundidade em torno de 8 Å. De acordo com o número de unidades formadoras de α -D-glicopirranose, elas podem ser classificadas como α (6 unidades), β (7 unidades) ou γ (8 unidades), o que lhes confere diferentes tamanhos de cavidade, isto é, 6, 8 ou 10 Å, respectivamente (Fathi et al., 2014). Dentre estas, as β -CDs são as de maior interesse e mais comumente utilizadas devido ao seu tamanho de cavidade intermediário e, principalmente, baixo valor (Pinho et al., 2014). Além disso, novas moléculas de CDs têm surgido de modo a se aprimorar a solubilidade em água e biocompatibilidade destas moléculas, como a HP- β -CD (Fathi et al., 2014).

Diante do exposto, as CDs têm sido muito exploradas para o encapsulamento de moléculas de interesse com características hidrofóbicas, como os óleos essenciais e seus derivados, formando complexos de inclusão (CIs) capazes de proteger tais moléculas dos efeitos adversos do ambiente, como temperatura, luz, pH, etc., aumentando sua vida útil, melhorando a solubilidade em água, reduzindo as quantidades necessárias para apresentar um efeito biológico e também permitindo a manipulação da liberação controlada destes no ambiente (Almenar et al., 2007; Fathi et al., 2014; Kfoury et al., 2015; Pinho et al., 2014).

Por exemplo, Hill et al. (2013) utilizaram os óleos essenciais puros de casca de canela e do botão do cravo, além dos seus compostos majoritários *trans*-cinamaldeído e eugenol, e suas formas encapsuladas em β -CD contra os patógenos *Salmonella enterica* e *Listeria innocua*, observando a total inibição do crescimento dos patógenos, exceto quando utilizado o eugenol. Os CIs formados foram capazes de inibir o desenvolvimento de ambos patógenos em concentrações inferiores do que os compostos não encapsulados.

Por outro lado, Gong et al. (2016) observaram uma significativa inibição do fitopatógeno *Peronophythora litchii* utilizando um CI formado entre β -CD e eugenol, demonstrando que o crescimento *in vitro* do fitopatógeno foi dependente das doses liberadas de eugenol no

ambiente ao longo do tempo de incubação. Além disso, tal CI também reduziu a severidade e incidência do fitopatógeno em frutos de lichia. No entanto, uma vez que o produto final formado entre as CDs e as moléculas de interesse como os óleos essenciais se apresenta em forma de pó, faz-se necessário o desenvolvimento de uma estrutura de suporte adequada à sua aplicação e ao produto de interesse, como matrizes biopoliméricas, embalagens plásticas, embalagens biodegradáveis, etc.

3.2.3. Embalagens bioativas

O desenvolvimento de embalagens funcionais tem sido buscado como uma estratégia tecnológica capaz de aumentar a qualidade e a segurança dos produtos alimentícios. Neste contexto, embalagens bioativas vêm despertando especial atenção nos últimos anos, sendo definidas como sistemas capazes de diminuir a deterioração dos alimentos, por ação antimicrobiana ou de preservação das características desejáveis dos alimentos por meio da liberação dos compostos incorporados (Cabral et al., 2013).

Diversos fatores devem ser considerados para o desenvolvimento de uma embalagem bioativa, tais como: natureza química do alimento e dos microrganismos, condições de armazenamento e distribuição, características organolépticas e toxicidade dos compostos, além das propriedades físicas e mecânicas das embalagens. Além disso, é importante ressaltar que, dependendo da permeabilidade da embalagem e do tempo de armazenamento, os compostos podem não apresentar os efeitos desejados por sofrer rápida degradação (Cabral et al., 2013).

Atualmente, diversas embalagens bioativas têm sido desenvolvidas e diferentes estratégias de aprisionamento dos compostos antimicrobianos têm sido utilizadas, como encapsulamento, enxerto ou incorporação direta dos agentes ativos aos polímeros, permitindo uma liberação controlada ao longo de um período determinado (Sadaka et al., 2014).

Ao serem aplicados revestimentos comestíveis contendo óleos essenciais em frutos e vegetais, um dos fatores limitantes é a alteração das características organolépticas dos alimentos revestidos, principalmente devido à grande quantidade de compostos voláteis liberados que mascaram o sabor natural destes (Lucera et al., 2012). No entanto, muitas vezes, estas misturas podem gerar interessantes resultados, como o estudo realizado por Tserennadmid et al. (2011) que

demonstraram que a utilização do óleo essencial de limão diretamente no suco de maçã, além de aumentar o tempo de armazenamento a temperaturas ambientes, resultou em um novo sabor ao produto, diferenciando-o dos demais e atingindo uma parcela diferente de consumidores.

Além disso, Raybudi-Massilia et al. (2008) observaram um aumento do tempo de prateleira em melões cortados em até 21 dias, a partir da utilização de um revestimento comestível a base de alginato contendo ácido málico e os óleos essenciais de canela, palmarosa e capim-limão. De forma semelhante, a incorporação dos óleos essenciais de capim-limão, orégano ou baunilha diretamente em um revestimento comestível de maçã e alginato, resultou na inibição do crescimento de mofo e leveduras em frutos de maçã cv. Fuji cortados, melhorando a qualidade sensorial quando aplicado apenas o óleo de baunilha (Rojas-Grau et al., 2007).

Neste sentido, o desenvolvimento de sistemas de armazenamento bioativos, como as embalagens bioativas, bem como o entendimento dos parâmetros que afetam os mecanismos de liberação controlada antes, durante e depois do processo de armazenamento, garantindo que as biomoléculas cheguem corretamente ao destino, impedindo o processo de infecção e desenvolvimento de fitopatógenos e, conseqüentemente, aumentando o tempo de prateleira dos frutos, sem modificar suas características físico-químicas negativamente, são de extrema importância.

CAPÍTULO 2 – ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE PALMAROSA (*Cymbopogon martinii*), ÁRVORE CHÁ (*Melaleuca alternifolia*) E ANIS ESTRELADO (*Illicium verum*) CONTRA *Penicillium expansum* E SEUS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO

1. Introdução

A maçã é uma das frutas mais apreciadas ao redor do mundo. Uma das principais doenças que acometem os frutos de maçã em pós-colheita é o bolor azul causado por *Penicillium expansum*, um fungo muito agressivo, cosmopolita, de rápida dispersão e que tolera condições adversas, sendo capaz de produzir a patulina, uma micotoxina que apresenta potencial carcinogênico e mutagênico (Rocha et al., 2014).

Por ser um grande problema ao pós-colheita de maçãs, há uma ampla utilização de fungicidas para seu controle (Zhang et al., 2011), e, por consequência, uma intensa busca por métodos alternativos de controle deste fitopatógeno, dado o aumento da percepção social acerca dos problemas relacionados ao meio ambiente e à saúde causados pela aplicação demasiada de produtos químicos, além do alto risco da seleção de isolados resistentes.

Dentre estas alternativas, pode-se destacar a utilização dos óleos essenciais (OEs), classificados como *GRAS* (*Generally Recognized As Safe*) pelo FDA dos EUA por apresentarem baixos riscos ao ambiente, e também aos seres humanos, possuindo efeitos antimicrobianos contra uma vasta gama de fitopatógenos (Bakkali et al., 2008).

Assim, o presente capítulo teve como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano de diferentes OEs, como anis estrelado (*Illicium verum*), árvore-chá (*Melaleuca alternifolia*), palmarosa (*Cymbopogon martinii*), entre outros, contra o fungo *P. expansum*, além de elucidar os seus possíveis mecanismos de ação.

2. Material e Métodos

Para o desenvolvimento do presente estudo, suspensões de conídios do fungo *P. expansum* provenientes da Micoteca Anne Lore Schroeder, armazenados sob o código MANE 138, foram preparadas em suco de maçã (4%), e calibradas na concentração de 1×10^5 conídios/mL com auxílio de um hemacitômetro, sendo expostas ao vapor dos OEs sob diferentes concentrações (125 ppm – 1000 ppm), por diferentes

tempos (1 – 24 horas), e incubados em placas de Petri plásticas (polipropileno) ou de vidro.

O efeito fungicida ou fungistático dos OEs foi determinado *in vitro*, utilizando-se placas de Petri de vidro, e os mecanismos de ação envolvidos avaliados por meio de ensaios de fluorescência utilizando os corantes calcofluor white stain (danos na parede celular), iodeto de propídeo (danos na membrana plasmática), e diacetato de fluoresceína (geração de espécies reativas de oxigênio - ROS), além da medição do extravasamento de DNA por meio de Nanodrop, e de proteínas, açúcares e da quantificação dos danos lipídicos, a partir dos métodos de Bradford (1976), Masuko et al. (2005), e Cerioni et al. (2010), respectivamente. Finalmente, a atividade antioxidante dos OEs foi avaliada por meio do método antioxidante do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Em adição, a atividade antimicrobiana do vapor dos OEs foi avaliada *in situ* usando frutos de maçã cv. Fuji inoculados com *P. expansum* à concentração de 1×10^4 conídios/mL, aferida em hemacitômetro, durante 12 dias incubados no escuro a temperatura ambiente.

3. Resultados e Discussão

3.1. Fase de vapor dos óleos essenciais (OEs) e suas atividades antimicrobianas contra *P. expansum*

Dentre os OEs testados na fase de vapor contra o fungo *P. expansum*, 7 apresentaram alta atividade antimicrobiana contra o fungo (Tabela 2.1) quando placas de Petri de vidro foram utilizadas, inibindo sua germinação em, aproximadamente, 40% (gengibre), 60% (cravo), e 100% (melaleuca, palmarosa, sálvia, anis estrelado e vetiver).

Devido às suas diferentes composições, diferentes concentrações de vapor dos OEs inibiram completamente a germinação dos conídios de *P. expansum*, como é o caso para os OEs de anis estrelado (125 ppm), melaleuca e palmarosa (250 ppm), e vetiver (750 ppm).

Além disso, diferentes tempos de contato entre os OEs e o fitopatógeno também afetaram a germinação dos conídios de *P. expansum* (Tabela 2.1). Neste sentido, para que a germinação dos conídios de *P. expansum* seja completamente inibida, os conídios foram expostos à fase de vapor dos OEs de anis estrelado e melaleuca por, ao menos, 3 horas, ao passo que este mesmo resultado foi alcançado apenas

quando utilizada a fase de vapor do OE de palmarosa por ao menos 4 horas, e o OE de vetiver por, ao menos, 6 horas (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Atividade antimicrobiana da fase de vapor dos diferentes óleos essenciais (OEs) de cravo, gengibre, melaleuca, palmarosa, sálvia e anis estrelado, a 1000 ppm, bem como as concentrações mínimas necessárias (após 24h de exposição), e o tempo mínimo necessário (a 500 ppm) para completa inibição *in vitro* da germinação do fungo *Penicillium expansum*.

Tratamentos	Germinação (%)	Concentração Mínima Inibitória (ppm)	Tempo Mínimo Inibitório (horas)
Água	94,7 ± 1,5 A	-	-
Cravo	36,5 ± 10,6 C	N/A	N/A
Gengibre	55,0 ± 11,8 B	N/A	N/A
Melaleuca	0 ± 0 D	250	3
Palmarosa	0 ± 0 D	250	4
Sálvia	0 ± 0 D	N/A	N/A
Anis estrelado	0 ± 0 D	125	3
Vetiver	0 ± 0 D	750	6

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). N/A – não avaliado.

Resultados similares foram encontrados por Singh et al. (2006) que ao utilizarem o vapor do OE de anis estrelado *in vitro* contra *P. citrium* e *P. viridicatum*, observaram uma inibição do crescimento micelial de 87,5% e 71,2%, respectivamente. Shao et al. (2013), utilizaram a fase de vapor do OE de melaleuca a 1000 ppm *in vitro* e verificaram a completa inibição da germinação e do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer*. Além disso, já foi demonstrado que os OEs extraídos de plantas do gênero *Cymbopogon* apresentam efeitos antimicrobianos contra uma vasta gama de fitopatógenos em pós-colheita, como, por exemplo, *Alternaria alternata*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *B. cinerea*, *Monilia fructigena*, *P. digitatum* e *P. expansum* (Frankova et al., 2016; Nguefack et al., 2009).

Os OEs de melaleuca, palmarosa e anis estrelado tiveram seus efeitos fungicidas confirmados em meio de cultivo (BDA) prevenindo o desenvolvimento de colônias de *P. expansum* mesmo após os OEs terem sido removidos do ambiente de incubação. Por outro lado, o número de colônias de *P. expansum* aumentou de 80 para 100 quando o OE de vetiver foi removido das placas de Petri, indicando apenas um efeito fungistático deste OE contra o fungo (dados não mostrados).

De acordo com os resultados obtidos, foi demonstrado que a atividade antimicrobiana de um determinado OE contra o fitopatógeno *P. expansum* depende de vários fatores, como sua natureza química, concentração a ser utilizada, tempo de contato, e também do método

utilizado. Tais resultados são consistentes com aqueles encontrados por Znini et al. (2013) que observaram que o OE de *Pulicaria mauritanica* apresentou um efeito fungicida ou fungistático contra *A. alternata* e *P. expansum in vitro*, sendo dependente do método utilizado, da sinergia entre os compostos do OE, e também de sua dose.

Assim, com base no apresentado, os resultados acerca dos mecanismos de ação e os efeitos *in situ* foram realizados apenas utilizando-se a fase de vapor dos OEs de palmarosa, melaleuca e anis estrelado.

3.2. Mecanismos de ação dos OEs contra *P. expansum*

Os OEs de melaleuca, palmarosa e anis estrelado não causaram danos à parede celular dos conídios de *P. expansum*, e nem geraram espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelulares mesmo após 6 horas de contato (dados não mostrados). Por outro lado, os 3 OEs estudados causaram danos à membrana plasmática dos conídios de *P. expansum* (Tabela 2.2).

Um aumento das unidades relativas de fluorescência foi observado após 3 horas de contato entre os OEs e o fungo, chegando a um máximo de $2,93 \times 10^5$, $2,90 \times 10^5$ e $2,16 \times 10^5$ unidades relativas de fluorescência após 6 horas de exposição aos OEs de anis estrelado, palmarosa e melaleuca, respectivamente, demonstrando que os danos à membrana plasmática dos conídios de *P. expansum* aumentaram com o passar do período de exposição, ao passo que no controle os valores variaram entre 1,60 e $1,55 \times 10^5$ unidades relativas de fluorescência (Tabela 2.2).

Tabela 2.2. Valores relativos aos danos na membrana plasmática do fungo *Penicillium expansum* ocasionados pelos óleos essenciais (OEs) de melaleuca, palmarosa e anis estrelado (500 ppm) mensurados em unidades relativas de absorvância (iodeto de propídeo), TBARS (espécies reativas de ácido tiobarbitúrico), e extravasamento de DNA, proteínas e açúcares.

Tratamentos	Tempo (horas)		
	0	3	6
Danos na Membrana Plasmática			
Unidades Relativas de Absorvância (x10000)			
Água	16,00 ± 0,79	11,66 ± 3,30 C	15,52 ± 0,82 C
Melaleuca	16,00 ± 0,79	13,76 ± 0,15 C	21,63 ± 0,41 B
Palmarosa	16,00 ± 0,79	17,56 ± 0,72 B	29,05 ± 4,25 A
Anis estrelado	16,00 ± 0,79	20,73 ± 0,85 A	29,33 ± 1,52 A
TBARS			
pmol de TBARS / grama de proteínas			
Água	0,99 ± 0,08	1,61 ± 0,50 B	1,23 ± 0,43 D
Melaleuca	0,99 ± 0,08	2,77 ± 0,49 B	4,53 ± 0,71 C
Palmarosa	0,99 ± 0,08	2,20 ± 0,60 B	5,87 ± 0,47 B
Anis estrelado	0,99 ± 0,08	5,87 ± 0,47 A	7,72 ± 0,29 A
Extravasamento de DNA			
ng de DNA / grama de micélio			
Água	0	11,50 ± 2,30 A	13,15 ± 1,34 D
Melaleuca	0	14,63 ± 0,38 B	19,63 ± 2,63 C
Palmarosa	0	18,65 ± 0,42 B	31,68 ± 3,80 B
Anis estrelado	0	47,49 ± 19,66 C	69,28 ± 5,31 A
Extravasamento de Proteínas			
µg de proteína / grama de micélio			
Água	5,38 ± 4,21	10,54 ± 0,09 C	10,96 ± 0,70 D
Melaleuca	5,38 ± 4,21	16,72 ± 1,13 B	18,68 ± 0,62 B
Palmarosa	5,38 ± 4,21	12,33 ± 1,50 C	14,61 ± 1,77 C
Anis estrelado	5,38 ± 4,21	34,72 ± 11,53 A	39,29 ± 12,64 A
Extravasamento de Açúcares			
mg de glicose / grama de micélio			
Água	1,24 ± 0,05	1,81 ± 0,10 C	1,64 ± 0,05 D
Melaleuca	1,24 ± 0,05	3,89 ± 0,32 A	5,78 ± 0,29 A
Palmarosa	1,24 ± 0,05	2,07 ± 0,11 B	2,40 ± 0,21 C
Anis estrelado	1,24 ± 0,05	2,29 ± 0,12 B	3,00 ± 0,01 B

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Estes resultados foram confirmados a partir da análise por TBARS, onde a suspensão de conídios de *P. expansum* exposto apenas à água destilada por até 6 horas não apresentou diferenças significativas nos níveis de TBARS (Tabela 2.2). No entanto, quando os conídios foram expostos aos OEs de melaleuca, palmarosa e anis estrelado por 3 horas, 2,77, 2,20 e 5,87 pmol de TBARS por g de proteína foram

quantificados, respectivamente (Tabela 2.2), chegando a 4,53, 5,87 e 7,72 pmol de TBARS por g de proteína após a exposição por 6 horas ao vapor dos OEs de melaleuca, palmarosa e anis estrelado, respectivamente (Tabela 2.2).

Além disto, um total de 2,40, 3,00 e 5,78 mg de glicose por g de massa úmida de micélio foi extravasada do micélio de *P. expansum* para o meio após 6 horas de exposição destes ao vapor dos OEs de palmarosa, anis estrelado e melaleuca, respectivamente (Tabela 2.2). Observou-se também um aumento no extravasamento de proteínas e de DNA do micélio do fitopatógeno para o meio ao longo do tempo, chegando a um máximo de 39,29, 18,68 e 14,61 µg de proteína por g de massa úmida de micélio e de 69,28, 31,68 e 19,63 ng de DNA por g de massa úmida de micélio após 6 horas de exposição destes ao vapor dos OEs de anis estrelado, palmarosa e melaleuca, respectivamente (Tabela 2.2).

Uma característica fundamental dos compostos dos OEs é a sua natureza hidrofóbica, o que lhes permite interagir com as camadas lipídicas da membrana plasmática dos fungos de diferentes formas, por exemplo, desfazendo as suas estruturas e, conseqüentemente, perturbando a integridade celular e assim levando ao extravasamento de compostos celulares, ou mudando a permeabilidade da membrana plasmática, afetando o fluxo de prótons e, deste modo, alterando as concentrações de íons intracelulares, levando a uma alteração dos processos metabólicos (Burt, 2004; Sivakumar e Bautista-Baños, 2014).

De fato, os dados coletados no presente estudo evidenciam que os OEs de melaleuca, palmarosa e anis estrelado são capazes de interagir com as camadas lipídicas celulares dos conídios de *P. expansum*, causando severos danos a estas, o que está de acordo com os resultados de Pérez-Alfonso et al. (2012) e Znini et al. (2013).

Estes danos podem ser atribuídos à capacidade antioxidante dos OEs de melaleuca, anis estrelado e palmarosa, que apresentaram uma alta capacidade de sequestrar os radicais livres em um ensaio realizado com DPPH, inibindo o consumo de DPPH em 29, 69 e 83%, respectivamente (dados não mostrados). Nesse sentido, a interação entre os OEs e os seus componentes com a membrana plasmática dos conídios de *P. expansum* parece ocorrer a partir do sequestro de moléculas de radicais livres presentes na membrana lipídica, a partir da reação com os íons H^+ , K^+ ou Ca^{2+} presentes na superfície ou através da membrana, causando os danos mencionados posteriormente, e estando de acordo com Prashar et al. (2003) e da Rocha Neto et al. (2015).

3.3. Efeito *in situ* do vapor dos OEs contra *P. expansum*

A incidência de *P. expansum* foi observada em todos os frutos 14 dias após a inoculação, independente do OE utilizado (dados não mostrados). Por outro lado, o vapor dos OEs de palmarosa e anis estrelado promoveram a redução significativa de 0,2 cm por dia no crescimento da lesão nos frutos de maçã em comparação aos tratados com o vapor do OE de melaleuca ou do controle, isto é, daqueles não tratados (dados não mostrados).

De acordo com Hac-Wydro et al. (2017) e Prakash et al. (2015), existem diversas limitações para o uso dos OEs como preservativos alimentares, tais como sua eficácia antimicrobiana, que depende diretamente do pH, temperatura e grau de contaminação do ambiente e do alimento; sua natureza volátil, que restringe sua aplicação devido à perda acidental durante a aplicação e transporte destes em embalagens, sua rápida degradação devido à composição química, isto é, sua oxidação pela luz e temperatura, além da interferência na palatabilidade do alimento, isto é, na possível modificação do sabor do alimento, restringindo a concentração máximo que os mesmos (OEs) possam ser utilizados.

Apesar de mínimas, as diferenças observadas no desenvolvimento do fungo *in situ* estão de acordo com os estudos mencionados anteriormente (Hac-Wydro et al., 2017; Prakash et al., 2015), e demonstram que a atividade antimicrobiana dos OEs é realmente dependente dos diversos fatores supracitados.

No entanto, tais limitações podem ser facilmente solucionadas utilizando diferentes técnicas, tais como o micro-encapsulamento (Almenar et al., 2007), revestimentos comestíveis (Guerreiro et al., 2015), nanofibras (Wen et al., 2016), embalagens bioativas (Malhotra et al., 2015), dentre outras, desde que sejam consideradas as interações entre os OEs, o material das embalagens e os fenômenos envolvidos (migração, permeação e absorção), e os frutos (Ribeiro-Santos et al., 2017).

4. Conclusão

Os óleos essenciais de melaleuca, palmarosa e anis estrelado utilizados na forma de vapor inibiram completamente a germinação *in vitro* de *P. expansum*, mesmo em baixas concentrações, como 125 ppm ou 250 ppm. Em adição, todos os OEs causaram o extravasamento de

açúcares, proteínas e DNA do patógeno para o meio, além de uma quantidade mensurável de danos lipídicos (TBARS), indicando que danos severos foram ocasionados na membrana plasmática do fitopatógeno. Por serem classificados como *GRAS*, poderiam ser uma alternativa aos fungicidas comumente utilizados para o controle do bolor azul no pós colheita de maçãs.

No entanto, por apresentarem diferentes moléculas, com diferentes estruturas, que estão diretamente correlacionadas com o potencial antimicrobiano e antioxidante dos OEs, outros estudos são necessários para melhor entender seus efeitos antimicrobianos contra o bolor azul, e seus efeitos sobre a fisiologia dos frutos de maçã e as possíveis interações com os materiais utilizados como embalagens.

CAPÍTULO 3 – FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA DE APRISIONAMENTO DE β -CICLODEXTRINAS E SEUS EFEITOS NA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS

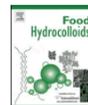
O presente capítulo teve por objetivo central encapsular os óleos essenciais (OEs) selecionados no capítulo anterior, bem como determinar a influência dos diversos fatores que podem afetar este processo. Tal objetivo foi baseado na necessidade de se proteger os OEs contra os fatores extrínsecos e intrínsecos a estes, tais como: temperatura do ambiente, umidade relativa (RH), sua natureza volátil, e sua rápida degradação relacionada a sua composição química, isto é, oxidação pela luz e temperatura, que podem afetar diretamente o seu potencial antimicrobiano contra o fungo *Penicillium expansum*. Ademais, com o processo de encapsulamento, vislumbra-se a sua utilização (OEs) em sistemas comerciais. Destaca-se aqui que o OE de *Melaleuca alternifolia* foi retirado das subseqüentes análises e, conseqüentemente, dos capítulos 3 e 4, por não constar no banco de dados do FDA como *GRAS* para utilização em alimentos. Isto possivelmente devido aos compostos presentes em sua composição e suas interações, isto é, terpinen-4-ol (~40%), gamma-terpeno (~20%), alpha-terpeno (~10%), terpinoleno (~3,5%), dentre outros.

Ademais, os resultados deste capítulo foram publicados na revista “Food Hydrocolloids”, Vol. 77 C, 2018, p. 510-524, e podem ser encontrados na íntegra por meio do endereço: <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.029>, assim como a seção de Material e Métodos e Introdução. A numeração das figuras e tabela abordadas neste capítulo segue a ordem e numeração utilizadas naquele artigo



Contents lists available at ScienceDirect

Food Hydrocolloids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodhyd

Factors affecting the entrapment efficiency of β -cyclodextrins and their effects on the formation of inclusion complexes containing essential oils



Argus Cezar da Rocha Neto ^{a, b}, Alanny Bahia de Oliveira da Rocha ^c, Marcelo Maraschin ^d, Robson Marcelo Di Piero ^a, Eva Almenar ^{b, *}

^a Laboratory of Plant Pathology, Crop Science Department, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 88040-900, Brazil

^b School of Packaging, Michigan State University, East Lansing, MI, 48824-1223, USA

^c Pharmacy Sciences Department, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 88040-970, Brazil

^d Laboratory of Morphogenesis and Plant Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 88040-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2017

Received in revised form

19 October 2017

Accepted 22 October 2017

Available online 27 October 2017

Keywords:

β -cyclodextrin

Inclusion complex

Entrapment efficiency

Essential oils

Palmarosa

Star anise

Chemical compounds studied in this article:

β -caryophyllene (PubChem CID

5281515)

β -cyclodextrin (PubChem CID

444041)

β -myrcene (PubChem CID

31253)

Trans-anethole (PubChem CID

637563)

Estragole (PubChem CID

8815)

Geraniol (PubChem CID

637566)

Geranyl-acetate (PubChem CID

1549026)

Limonene (PubChem CID

440917)

Linalool (PubChem CID

6549)

Ocimene (PubChem CID

18756)

ABSTRACT

β -cyclodextrins (β -CDs) are macrocyclic molecules made from starch capable of entrapping hydrophobic compounds in an aqueous solution. This study aimed to determine, for the first time, the main factors that affect the entrapment efficiency (EE) of β -CDs using the essential oils (EOs) of palmarosa and star anise as guest models of hydrophobic compounds. The results show that the EE of β -CDs was greatly affected by the β -CD intramolecular water content, EO/ β -CD adding order, EO type, EO concentration, drying process type, and extraction solvent type. Consequently, the EE of β -CDs varied from 1.05 to 63.7% and from 9.84 to 70.7% for palmarosa and star anise EOs, respectively, depending on the changes made to the above listed factors. The novel inclusion complexes were thermally and physico-chemically characterized, and their release kinetics measured over different environmental conditions to relate structural information to both entrapment and controlled release. This study demonstrates the importance of the aforementioned factors in obtaining the adequate EE values and provides guidance in optimizing the EE of β -CDs.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. 448 Wilson Road, Room 130, Packaging Building.

Michigan State University, East Lansing, MI, 48824-1223, USA.

E-mail address: calmenar@msu.edu (E. Almenar).

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.029>

0268-005X/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

RESUMO

As β -ciclodextrinas (β -CDs) são macromoléculas de amido capazes de aprisionar compostos hidrofóbicos em soluções aquosas. O objetivo deste estudo foi determinar, pela primeira vez, os principais fatores que afetam a eficiência de aprisionamento (EA) das β -CDs utilizando os óleos essenciais (OEs) de palmarosa e anis estrelado como modelos de moléculas hidrofóbicas. Os resultados obtidos demonstram que a EA das β -CDs é afetada por diferentes fatores, como a quantidade intramolecular de água, a ordem de adição entre os OEs e as β -CDs, a composição química dos OEs, a concentração de OEs utilizados, o processo de secagem, e o solvente de extração utilizado. Consequentemente, a EA das β -CDs variou entre 1,05 a 63,7% e de 9,84 a 70,7%, para os OEs de palmarosa e anis estrelado, respectivamente. Os novos complexos de inclusão (ICs) obtidos foram caracterizados térmica e físico-quimicamente, e sua cinética de liberação medida em diferentes condições ambientais de modo a se relacionar as informações de estrutura às informações de aprisionamento e liberação controlada. Este estudo demonstrou a importância dos diversos fatores acima mencionados de modo a se obter valores adequados de EA, servindo como um guia para a otimização da EA das β -CD.

1. Introdução

1.1. Caracterização dos óleos essenciais (OEs)

De modo a se identificar as características físico-químicas relacionadas às interações existentes entre os OEs e as β -ciclodextrinas (β -CDs), capazes de formar diferentes complexos de inclusão (ICs), os OEs utilizados foram caracterizados quanto às suas composições químicas, incluindo os componentes voláteis e suas quantidades relativas, além de determinadas suas solubilidades em água (mg/mL). Os resultados desta caracterização podem ser encontrados na Tabela 1 do artigo. As análises dos OEs por meio de cromatografia gasosa acoplada ao detector de massas (GC/MS) revelou a presença de 7 e 6 compostos voláteis nos OEs de palmarosa e anis estrelado, respectivamente. O composto majoritário encontrado no OE de palmarosa foi identificado como o monoterpene geraniol (73,53 %), seguido dos compostos acetato de geraniol (11,58 %) e linalool (6,46 %), ao passo que, para o OE de anis estrelado, foram encontrados como compostos majoritários o éter aromático não-saturado *trans*-anetol (72,84 %), o fenil propano estragol (16,80 %), e o linalool (4,41 %).

Tais resultados estão de acordo com os encontrados por Rao et al. (2005), que descrevem o geraniol, acetato de geraniol e linalool como os principais constituintes do OE de palmarosa, e também com Singh et al. (2006), que reportaram os compostos *trans*-anetol e estragol como os principais constituintes do OE de anis estrelado. Deste modo, os OEs utilizados neste estudo foram considerados como puros, sem adulterações ou contaminações e, assim, aceitáveis para o uso.

A diferença da composição química existente entre os OEs ocasiona uma diferença em sua solubilidade aquosa. Os compostos geraniol e acetato de geraniol, os dois principais compostos do OE de palmarosa (85,11%), são classificados, respectivamente, como pouco e muito pouco solúvel em água, ao passo que o *trans*-anetol e o estragol, os principais compostos do OE de anis estrelado (89,64%), são respectivamente considerados como muito pouco solúveis ou praticamente insolúveis em água. Consequentemente, conclui-se que o OE de palmarosa é mais solúvel em água do que o OE de anis estrelado. Todas as relações entre quantidade relativa e solubilidade destes e dos demais compostos podem ser encontradas na Tabela 1 do artigo. Tais relações foram determinadas para melhor se compreender os diferentes efeitos do tipo de solvente extrator na EA (seção 1.2.1), dentre outros.

A solubilidade de um determinado composto em um determinado solvente define a quantidade máxima que este composto será completamente dissolvido no solvente de interesse. Deste modo, se o composto é classificado como praticamente insolúvel em água apenas uma pequena fração deste será dissolvido, neste caso, em água. Isto irá resultar em baixos valores de absorvância e, conseqüentemente, em uma baixa EA, mesmo se a EA inicial foi grande. Tais observações estão de acordo com o trabalho de Wan et al. (2017), que reportaram que, quando misturados em água, o geraniol e o linalool não são devidamente detectados por espectrofotometria de UV-vis devido à sua baixa solubilidade em água, o que previne sua completa dissolução neste solvente. Deste modo, a seleção de um solvente adequado para extração é de fundamental importância quando se tenta determinar a EA de uma determinada molécula.

1.2. Efeitos de diferentes fatores sobre a eficiência de aprisionamento (EA) das β -CDs

A quantidade de água intramolecular das β -CD, a composição e a concentração dos OEs, bem como a ordem de adição dos compostos nos solventes (OEs antes ou depois das β -CD), o processo de secagem dos ICs formados, e o tipo de solvente extrator são fatores que apresentaram efeitos distintos na EA das β -CDs, e serão discutidos abaixo.

1.2.1. Efeitos do tipo de solvente para extração

A Figura 1 do artigo mostra como o tipo de solvente de extração afeta a EA das β -CD. Nota-se que a menor recuperação para ambos OEs a partir das β -CD ocorre quando o solvente orgânico acetonitrila é utilizado como extrator (Figuras 1A e E). Neste sentido, uma menor quantidade do OE de palmarosa foi recuperada em comparação com o OE de anis estrelado quando utilizado acetonitrila, indicando a menor afinidade dos principais compostos do OE de palmarosa com o solvente em questão. No outro extremo, a maior recuperação do OE de palmarosa a partir das β -CD ocorreu quando a água foi utilizada como solvente (Figura 1D). Por outro lado, a maior recuperação do OE de anis estrelado ocorreu utilizando-se metanol (Figura 1F) ou uma mistura de metanol: água (Figura 1G) como solventes.

Quando utilizado como solvente, a água não foi capaz de recuperar mais do que 60% dos compostos de ambos OEs, devido à baixa solubilidade destes (Tabela 1). No entanto, observou-se uma maior recuperação para os compostos do OE de palmarosa em comparação aos compostos do OE de anis estrelado, possivelmente devido à maior solubilidade em água dos compostos do primeiro em relação ao segundo (Tabela 1). No entanto, a quantidade de óleo recuperada dos ICs formados, isto é, ICp (palmarosa) e ICsa (anis estrelado) foram similares (Figuras 1D e H). Isto pode ser atribuído à diferente solubilidade em água dos compostos não voláteis dos OEs que contribuem para o EA, o que é maior no caso do OE de anis estrelado.

O metanol se mostrou um bom solvente de extração para o OE de anis estrelado puro, e também quando misturado em água (EA ~ 80%). Estes resultados mostram que, embora os OEs sejam considerados altamente solúveis em solventes orgânicos, o tipo de solvente orgânico (isto é, metanol versus acetonitrila) afeta de forma significativa a EA resultante, o que está em conformidade com o trabalho de Reineccius et al. (2005). Além disso, quando utilizada para calcular a EA das β -CD (Samperio et al., 2010), a água deveria ser considerada apenas como um solvente de extração para os OEs que possuem compostos de baixa solubilidade em solventes polares.

Enquanto a EA é comumente avaliada usando-se apenas um único solvente para a extração do *guest* (aprisionado/encapsulado) a partir do *host* (aprisionante/encapsulante), os resultados acima demonstram que a utilização de diferentes solventes para extrair o *guest* (composto único ou uma mistura de compostos diferentes, como os OEs) deveria ser considerada. Deste modo, a seleção do solvente de extração deve ser decidida somente após uma cuidadosa caracterização da composição química do *guest*.

1.2.2. Efeitos dos tipos de OEs e suas concentrações

O tipo de OE também afetou a EA das β -CD, onde o ICsa apresentou maior EA do que o ICp, com um aumento de 2 a 3 vezes, dependendo do tipo de solvente de extração utilizado (Figura 1). Tais diferenças na EA podem ser atribuídas à composição diferente dos EOs utilizados (Tabela 1). O geraniol e acetato de geraniol, que constituem cerca de 85,11% do OE de palmarosa, são, respectivamente, um éster de cadeia com 8 átomos de carbono, e um éster de cadeia com 10 carbonos, ao passo que o *trans*-anetol e o estragol, que constituem aproximadamente 89,64% do OE de anis estrelado, são isômeros de 10

carbonos que diferem quanto à localização da ligação dupla que contém o anel aromático. A diferença química entre os principais compostos dos dois óleos se traduz em diferenças de afinidade, peso molecular e também solubilidade, que resultam em diferentes capacidades de complexação com as β -CD e, conseqüentemente, na formação de diferentes ICs (Figura 1).

Por exemplo, o geraniol, o principal composto do OE de palmarosa, está possivelmente preso à β -CD devido as ligações de hidrogênio formadas entre o grupo hidroxila do geraniol e o grupo hidroxila primário da cavidade das β -CD (Kayaci et al., 2014), ao passo que o *trans*-anetol, principal composto do OE de anis estrelado, está possivelmente formando fortes ligações com os prótons das β -CD, entrando na cavidade destas por meio do seu grupo metoxilo ou etileno (Kfoury et al., 2014). Da mesma forma, Hill et al. (2013) observaram diferentes EA ao utilizarem os OEs do extrato de broto de cravo e do extrato de casca de canela (77,47% e 41,72%, respectivamente).

O efeito da concentração dos OEs na EA das β -CD depende fortemente do tipo de óleo (Figura 1). Para o OE de palmarosa, uma maior concentração do óleo (3%) resultou em uma maior EA ($p < 0,05$), independentemente do solvente utilizado. Concentrações menores do OE tiveram pouco efeito sobre a EA das β -CD. Por exemplo, quando a água foi utilizada como solvente, uma EA de 64% foi obtida para o ICp, ao passo que o OE de palmarosa a 3% diminuiu para aproximadamente 40% os demais ICp (Figura 1D). Estes resultados são semelhantes aos relatados por Ayala-Zavala et al. (2008), que observaram um aumento da EA das β -CD à medida que houve um aumento da quantidade de óleo de canela e óleo de alho na solução. Em contraste, uma concentração aumentada do OE de anis estrelado (0,3 e 3%) resultou em uma mesma ou pouca diminuição da EA das β -CD, sendo que tal diminuição só foi observada quando os solventes metanol e água foram utilizados (Figura 1F e H).

Os resultados da cromatografia gasosa acoplada ao detector de chama iônica (GC-FID) (Figura 2), obtidos sem o uso de solventes, confirmaram os resultados acima: (1) a maior EA das β -CD foi obtida com o OE de anis estrelado e não com o OE de palmarosa e; (2) quanto maior a concentração de um OE, maior a EA para o ICp, mas não para o ICsa. Com base nos resultados acima, as seções 1.2.3 a 1.2.5 (3.2.3 a 3.2.5 do artigo) apresentam e discutem apenas os resultados de EA obtidos usando como solventes de extração água, e metanol: água para

os ICp e ICsa, respectivamente, sendo ambos obtidos utilizando a concentração do OE de 3%.

1.2.3. Efeitos do conteúdo de água intramolecular das β -CD

O processo de encapsulamento/aprisionamento de um *guest* lipofílico nas β -CDs têm sido relatado na literatura ocorrendo a nível supramolecular, com a substituição das moléculas de água que ocupam a cavidade central das β -CD por um *guest* lipofílico ou por suas frações, sendo mantidos dentro desta cavidade por forças hidrofóbicas e por interações de van de Waals (Pinho et al., 2014). Acredita-se que tal processo pode ser facilitado quando as moléculas de água presentes na cavidade central das β -CD são removidas por meio de um processo prévio de secagem, por exemplo, secagem em estufa ou liofilização. No entanto, os efeitos do tempo de secagem no comportamento das β -CDs não são muito conhecidos.

Neste sentido, sabe-se que as β -CDs ocorrem na natureza como conglomerados e não como uma única partícula (Joo et al., 2012). No presente trabalho, verificou-se que tais conglomerados aumentavam de tamanho à medida que o tempo de secagem foi aumentado (Figura 3). Tal mudança conformacional pode ser atribuída ao agrupamento dos conglomerados devido à perda das moléculas de água intramoleculares, liberando grupamentos químicos existentes nas moléculas das β -CDs para formar novas ligações entre elas.

Tal mudança na quantidade de moléculas de água dentro da cavidade das β -CDs e sua conformação impactou diretamente na EA das β -CDs (Figura 4). O tempo de secagem das β -CDs antes do processo de encapsulamento/aprisionamento afetou diretamente a quantidade do OE de palmarosa que foi aprisionado, aumentando em 50% a EA quando as β -CDs foram secas em estufa a vácuo por 30 minutos quando comparado a não secagem (0 minutos) ou 15 minutos de secagem (Figura 4A). Em contraste, quantidades semelhantes do OE de anis estrelado foram aprisionadas quando as β -CDs foram secas ou não (Figura 4B). Tal diferença na EA pode ser atribuída à diferente composição química dos componentes principais dos OEs em questão, resultando em uma maior interação dos componentes do OE de palmarosa com os grupamentos disponíveis na cavidade das β -CDs anteriormente ocupadas com moléculas de água e, deste modo, preenchendo-as com o OE.

Kayaci et al. (2014) foram capazes de aprisionar uma fração do composto geraniol, o principal composto do OE de palmarosa em β -CD,

a partir de ligações formadas entre o grupo hidroxilo do geraniol e do grupamento hidroxilo primário existente na cavidade das β -CDs. Por outro lado, foi relatado que o *trans*-anetol, o principal composto do OE de anis estrelado é capaz de formar fortes ligações com os prótons das β -CDs, penetrando diretamente em sua cavidade por meio de seu grupamento metoxilo ou etileno (Kfoury et al., 2014). Assim, o deslocamento das moléculas parece facilitar o processo de encapsulamento de um *guest* nas β -CDs. No entanto, tal processo funciona apenas para moléculas capazes de preencher as áreas da cavidade das β -CDs anteriormente ocupadas pelas moléculas de água.

Embora a substituição das moléculas de água que ocupam a cavidade central das β -CDs por um *guest* tenha sido sugerida como a força que impulsiona a complexação, isto é, o aprisionamento/encapsulamento (Galvão et al., 2015), os resultados do presente trabalho demonstram que a composição do *guest* é tão crítica para a EA quanto a quantidade de água existente na cavidade central das β -CDs.

1.2.4. Efeitos do processo de secagem dos ICs

O impacto na EA do tipo de processo utilizado para secar os ICs formados é ilustrado na Figura 5 do artigo. Observou-se um decaimento de aproximadamente 3 vezes na EA do ICp quando utilizado o processo de liofilização (EA = 23,16%) em comparação ao processo de secagem em estufa (EA = 63,72%) (Figura 5A). Esta diferença pode ser atribuída à perda do geraniol que, possivelmente, estava ligado às moléculas de água que foram removidas da cavidade das β -CD durante o processo de sublimação.

Teoricamente, a formação de pontes de hidrogênio entre o geraniol e as moléculas de água que ocupam a cavidade das β -CD é viável devido às características químicas das duas moléculas. Assim, possivelmente não foram observadas perdas de geraniol ligada às moléculas de água durante o processo de secagem em estufa devido ao uso de uma temperatura de secagem muito abaixo do ponto de ebulição do geraniol. Outros compostos do OE de palmarosa não parecem ter contribuído significativamente para as perdas na EA causadas pelos diferentes processos de secagem, uma vez que apenas a perda do principal composto do OE de palmarosa poderia justificar uma EA 3 vezes menor de um processo em relação ao outro.

Por outro lado, não foram observadas diferenças na EA para os ICsa, independente dos processos acima mencionados (Figura 5B). Tal fato pode ser explicado devido às ligações formadas serem mais fortes entre as β -CD e o *trans*-anetol, em comparação às ligações entre as β -CD e o geraniol. Sabe-se que o *trans*-anetol forma ligações com os prótons das β -CD (Kfoury et al., 2014), ao passo que o geraniol é ligado às β -CD principalmente por interações de van der Waals (Kayaci et al., 2014). Tais tipos de ligações permitiram que o *trans*-anetol fosse mantido dentro da cavidade central das β -CD durante as condições severas do processo de sublimação, o que não ocorreu com o geraniol durante o processo de liofilização.

Assim, o processo de liofilização utilizado para secagem dos ICs mostrou-se mais severo do que o método de secagem por estufa, onde a ausência do vácuo associado com uma temperatura mais amena foi mais eficiente para manter os OEs aprisionados nas β -CD, uma vez que tal processo não afetou as interações existentes entre as moléculas dos OEs e os grupamentos químicos da cavidade central das β -CD. Hernández-Sánchez et al. (2016) relataram que a liofilização era mais eficiente do que a secagem por pulverização ou mesmo em estufa a vácuo na secagem dos ICs formados entre β -CD e o OE de cravo. No entanto, além de diferentes OEs, as configurações utilizadas pelos autores foram muito diferentes daquelas utilizadas no presente trabalho (6h, 100 Pa e $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ vs. 24h, 1333 Pa e $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$).

1.2.5. Efeitos da ordem de adição dos OEs

A ordem pela qual os OEs e as β -CDs foram adicionados em solução também afetou a EA das β -CD. Quando os OEs foram adicionados em água antes da β -CD, a EA foi reduzida de 63,72% para 34,04%, e de 70,71% para 60,82%, para ICp e ICsa, respectivamente (Figura 6). Estas diferenças podem ser atribuídas à redução da solubilidade em água das β -CD devido à presença dos OEs (Costa, Medronho, Gonçalves e Romano, 2015), resultando em uma menor quantidade de β -CD disponíveis em solução para o encapsulamento dos compostos dos OEs.

1.3. Caracterização térmica

Os perfis térmicos obtidos a partir da calorimetria diferencial de varredura (DSC) e por termogravimetria (TGA) para os ICs formados, isto é, ICp e ICsa foram comparados com os das β -CD e também com os

dos OEs para confirmar o aprisionamento dos OEs nas β -CD, e também para determinar suas propriedades térmicas.

A curva de DSC do OE de palmarosa (Figura 7A) apresentou três picos endotérmicos, onde os picos em torno de 25 e 220 °C correspondem aos pontos de fusão e ebulição do OE, e o pico em torno de 315 °C é relacionado ao seu ponto de fulgor. Além disso, observou-se um pico exotérmico em torno de 348 °C, atribuído à degradação do OE de palmarosa. Da mesma forma, a curva de DSC do OE de anis estrelado também apresentou três picos endotérmicos por volta de 22, 225 e 330 °C, e um pico exotérmico em torno de 343 °C, sendo associados aos pontos de fusão, ebulição, fulgor e degradação do OE de anis estrelado, respectivamente (Figura 7A).

Tais resultados estão de acordo com aqueles encontrados no banco de dados “PubChem Substance” (2017), e também com os resultados publicados por Menezes et al. (2012) para geraniol, Kfoury et al. (2014) para o *trans*-anetol, Menezes et al. (2014) para linalool, e Kfoury, Auezova, Ruella, Greige-Gerges e Fourmentin (2015) para estragole.

Por outro lado, a curva de DSC das β -CD apresentou dois picos endotérmicos em torno de 100 e 300 °C, além de um pico exotérmico por volta de 325 °C (Figura 7B). O primeiro pico endotérmico foi atribuído à existência de água intramolecular presa na cavidade das β -CD conforme proposto em literatura e, devido ao seu tamanho reduzido, há confirmação de que a maioria da água existente foi removida com sucesso quando as β -CD foram secas durante 30 minutos (Figura 8). Os outros dois picos exibidos correspondem aos pontos de fusão e decomposição das β -CD, respectivamente. Da mesma forma, Kohata, Jyodoi e Ohyoshu (1993) relataram, a partir da análise em DSC, que os pontos de fusão e decomposição das β -CD desidratadas ocorreram por volta de 300 e 320 °C, respectivamente.

As curvas de DSC dos ICs formados, isto é, ICp e ICsa (Figura 7B) não apresentaram os picos endotérmicos observados nas curvas dos OEs, apresentando picos muito semelhantes àqueles observados nas curvas das β -CD. Tais resultados corroboram que, de fato, houve um completo aprisionamento dos OEs na cavidade central das β -CD. Da mesma forma, Nieddu et al. (2014) afirmaram que o desaparecimento total ou parcial de picos de um *guest* após a formação de um IC é, frequentemente, considerado como indicativo do encapsulamento do *guest* no *host*, isto é, β -CD.

A figura 7C e D traz as curvas de TGA das β -CD, dos OEs, e também dos ICp e ICsa. Os OEs apresentaram uma temperatura inicial de evaporação a partir dos 90 °C, com o processo essencialmente completo em torno de 170 °C (DW > 95%; Figura 7C). Tal resultado corrobora com a identificação dos picos gerados no DSC como ponto de ebulição dos OEs, em torno dos 220 °C (Figura 7A). As temperaturas ligeiramente mais altas nas quais os picos foram observados nos diferentes métodos podem ser explicadas devido ao uso de diferentes taxas de calor e também pelos diferentes gases utilizados, isto é, nitrogênio puro vs. nitrogênio misturado com ar puro.

Da mesma forma, o início da degradação das β -CD ocorreu entre 320 e 350 °C (DW ~ 80%; Figura 7D), sendo mostrada como um pico no DSC a 325 °C (Figura 7B). Tal degradação significativa das β -CD a partir de 320 °C e com término em 350 °C foi previamente relatada por Zhang et al. (2015) e por Menezes et al. (2012). A completa degradação das β -CD ocorreu a 550 °C, estando de acordo com Kohata et al. (1993). Além disso, as curvas de TGA relativas aos compostos *trans*-anetol e geraniol também estão de acordo com a literatura (Menezes et al., 2012; Zhang et al., 2015).

Ambos ICs apresentaram uma estabilidade térmica menor do que a encontrada para as β -CD (Figura 7D). No entanto, embora tenha sido encontrada uma mesma temperatura inicial de degradação para ambos ICs (180 °C), observou-se uma maior estabilidade térmica do ICsa em comparação ao ICp. Deste modo, o aprisionamento de um OE em β -CD diminui consideravelmente a estabilidade térmica da β -CD, sendo dependente do tipo de OE encapsulado. Tais diferenças podem ser relacionadas às diferentes ligações formadas entre os OEs e as β -CD.

Embora a perda de massa mais rápida dos ICs comparadas às β -CD possa ser atribuída à perda dos OEs, isto parece improvável, uma vez que ambos os OEs possuíam pontos de ebulição semelhantes, ao passo que a perda de massa de ambos ICs ocorreu em função da temperatura de modos diferentes. Tais resultados novamente confirmam a inclusão por complexação entre os OEs de palmarosa ou anis estrelado e as β -CD.

Além disso, os resultados também mostram que o aprisionamento dos OEs em β -CD resulta em um aumento da estabilidade térmica dos OEs. Este aumento da estabilidade térmica dos *guest*, por exemplo, OEs presos em diferentes tipos de ciclodextrinas, foi previamente relatado por Higuera, Lopes-Carballo, Cerisuelo, Gavara e Hernandez-Munoz (2013); Kayaci et al. (2014); Marcolino, Zanin, Durrant, Benassi e Matioli (2011).

1.4. Caracterização físico-química

1.4.1. Difração de Raio-X em pó

A figura 9 do artigo traz os espectros dos padrões de difração de Raio-X em pó das β -CD e dos complexos de inclusão ICp e ICsa. As β -CD exibiram diversos picos cristalinos variando de 2,5 a 40° (2 θ). Os picos em 2 θ = 9,5; 12,8; 13,3; 18,1; 24,7 e 35° indicam a forma cristalina das β -CD. Embora não idênticos, tais resultados são similares aos reportados por Chen e Liu (2016), e Wang et al. (2014). Estas diferenças nos resultados podem ser explicadas devido à mudança conformacional do tipo *cage* para o tipo *channel* das β -CD, causadas pela secagem prévia em estufa a vácuo, estando de acordo com Uyar, Hunt, Gracz e Tonelli (2006).

O padrão de difração do tipo *channel* ocorre quando as β -CD estão alinhadas e empilhadas em cima uma das outras. Tal configuração das β -CD é geralmente observada quando os complexos de inclusão são formados (Kayaci et al., 2014; Rusa et al., 2002). Em nosso estudo, a ocorrência de picos que se sobrepõe entre os espectros de difração de Raio-X em pó dos ICs e das β -CD confirmam a conformação do tipo *channel* dos ICs formados, isto é, ICp e ICsa. No entanto, picos distintos também foram observados nos ICs. Tais picos foram observados em 2 θ = 6,9; 11,9; e 33° para o ICp, e em 2 θ = 6,78; 15,18; 16,3; 20,6; e 24,5° para o ICsa. Isto reforça a formação de novas estruturas cristalinas e, portanto, confirma o aprisionamento/encapsulamento dos OEs nas β -CD.

1.4.2. Reflectância total atenuada de espectroscopia de infravermelho de transformação de Fourier (ATR-FTIR)

A técnica de ATR-FTIR foi utilizada para confirmar o aprisionamento dos OEs nas β -CD a partir da comparação entre os espectros (posição e intensidade dos picos) dos complexos de inclusão formados (ICp e ICsa) com os espectros obtidos das β -CD e dos OEs (palmarosa e anis estrelado). Em adição, os espectros dos principais compostos de cada OE também foram apresentados para se identificar as diferenças e similaridades entre estes compostos e os ICs formados.

O espectro das β -CD (Figura 10A e 10B) apresentou um pico amplo na região de 3400 cm⁻¹, representando o estiramento vibracional de O-H, e outro pico em 2976 cm⁻¹ devido às vibrações de C-H. Picos

na região específica (*fingerpint*) do espectro foram encontrados em 1160, 1100, 1035, 810 e 750 cm^{-1} . Tais picos estão de acordo com aqueles reportados por Kfoury et al. (2014) e Wang et al. (2014).

Os picos em 3390, 2980, 2935, 2046 e 2025 cm^{-1} observados no espectro do OE de palmarosa (Figura 10A) demonstram as interações que ocorreram entre os grupamentos O-H, C-H e CH_2 . Outros picos foram observados próximos da região do *fingerpint* no espectro do OE de palmarosa em 1750 e 1715 cm^{-1} , relativos ao estiramento vibracional de grupamento C=O, em 1455 cm^{-1} , relativo ao grupamento OH, em 1385 cm^{-1} associado ao grupamento CH_2 , em 1246 e em 1100 cm^{-1} devido às vibrações de C-C-C, e em 1010 cm^{-1} relativo às vibrações de estiramento de C=C (Figura 10A).

Além destes, o espectro do OE de palmarosa apresentou picos idênticos àqueles apresentados nos compostos geraniol, acetato de geraniol e linalool. No entanto, mesmo presentes na mesma região, os picos diferiram em intensidade, forma e/ou posição. Por exemplo, a vibração devido ao estiramento em 1750 cm^{-1} relativo ao grupamento C=O do OE de palmarosa fora observada em 1740 cm^{-1} , e com uma maior intensidade no espectro do acetato de geraniol (Figura 10A). Em contraste, o pico observado em 1720 cm^{-1} no OE de palmarosa foi observado em outra posição do espectro do geraniol (1680 cm^{-1}), no entanto, com a mesma intensidade (Figura 10A). Os espectros de geraniol e linalool encontrados na Figura 10A estão de acordo com Menezes et al. (2014 e 2012), respectivamente.

O espectro do OE de anis estrelado apresentou diversos picos na região inespecífica (*non-fingerpint*) associadas às interações dos grupamentos O-H, C-H e CH_2 (3024, 2965 e 2850 cm^{-1}). Por outro lado, a região específica (*fingerpint*) do espectro do OE de anis estrelado apresentou diversos picos proeminentes em 1600, 1515 e 1500 cm^{-1} devido as vibrações decorrentes do estiramento de C=C, em 1465, 1280 e 1244 cm^{-1} associadas as vibrações de C-O-C, em 1174 e 1035 cm^{-1} decorrentes das vibrações de C-O, em 965 e 840 cm^{-1} relacionadas as vibrações de C-H, e em 833 e 790 cm^{-1} as vibrações de C-H. Em adição, o espectro do OE de anis estrelado foi praticamente idêntico aos espectros de *trans*-anetol e estragol (Figura 10B), que correspondem a cerca de 92% dos compostos encontrados no OE de anis estrelado (Tabela 1). Ademais, os espectros de *trans*-anetol e do estragol apresentados na Figura 10B estão de acordo com os encontrados por Kfoury et al. (2014 e 2015), e com Zhang et al. (2015).

Os espectros dos complexos de inclusão formados (ICp e ICsa) não apresentaram grande parte dos picos observados em ambos OEs. Os

poucos picos remanescentes foram observados em 1770, 1415 e 1381 cm^{-1} relativos ao OE de palmarosa (Figura 10A), e em 1656, 1558 e 1296 cm^{-1} relativos ao OE de anis estrelado (Figura 10B). Tais picos também podem ser observados nos espectros dos compostos principais dos OEs com pequenas modificações devido às interações entre os compostos dos OEs e as β -CD.

As diferenças observadas entre os espectros dos ICs formados e os espectros dos OEs indicam que aproximadamente todos os compostos de cada um dos OEs foram incluídos nas cavidades das β -CD com sucesso. O mesmo raciocínio foi reportado utilizando-se compostos individuais no encapsulamento utilizando as β -CD (Gong et al., 2016; Kfoury et al., 2014 e 2015; Rakmai, Cheirsilp, Mejuto, Torrado-Agrasar e Simal-Gandara, 2017b).

1.5. Cinética de liberação dos OEs a partir dos ICs formados

A liberação dos OEs de palmarosa e anis estrelado a partir dos ICp e ICsa, em função da umidade relativa (UR) do ambiente (0, 45 e 98%) e temperatura (4, 23 e 40 °C) são apresentados na Figura 11 do artigo. Em ambos os casos, temperatura e umidade relativa impactaram de forma significativa a liberação dos OEs. A menor quantidade de ambos os OEs foram liberados das β -CD quando os ICs foram expostos à umidade relativa de 0%, independentemente da temperatura do ambiente utilizada (Figura 11A e D). No outro extremo, o efeito da alta umidade relativa foi dependente do tipo de OE.

Já a liberação do OE de anis estrelado do ICsa aumentou quando a UR também aumentou, ao passo que a liberação do OE de palmarosa a partir do ICp foi semelhante para as duas UR, em todas as temperaturas. Em relação à temperatura, a medida que a mesma aumentou, houve também um aumento na liberação do OE de palmarosa, com um incremento de aproximadamente 100 ppm quando a temperatura passou de 4 para 40 °C (Figura 11A-C). No entanto, a quantidade máxima do OE de anis estrelado foi liberada aos 23 °C, e não aos 40 °C (Figura 11E e F). De fato, a quantidade do OE de anis estrelado liberado a partir do IC após 24h foi a mesma em ambas temperaturas, no entanto, aos 23 °C, os compostos continuaram sendo liberados, ao passo que aos 40 °C, os compostos começaram a ser re-aprisionados/re-encapsulados. Este re-encapsulamento do OE de anis estrelado foi observado em todas as UR testadas (Figura 11F).

As demais combinações entre temperatura/UR resultaram em uma liberação gradual do OE de anis estrelado ao longo do tempo. Da mesma forma, um aumento na volatilização em função do tempo também foi observado para o OE de palmarosa para todas as combinações de temperatura e UR, exceto para a temperatura mais baixa (4 °C), onde a quantidade de OE de palmarosa foi a mesma a partir de 24h, independente da UR utilizada (Figura 11A).

Portanto, a exposição dos ICs a uma baixa temperatura (4 °C) e baixa UR (0%) resulta na menor liberação de ambos OEs a partir das β -CD (Figura 11A e D), ao passo que a quantidade máxima do OE de palmarosa (97 ppm) foi obtida quando o ICp foi exposto a uma maior temperatura (40 °C) e UR mediana (45%), enquanto que a quantidade máxima do OE de anis estrelado (63 ppm) foi obtida quando o ICsa foi exposto a 23 °C e 98% UR (Figura 11A e E).

Estes resultados demonstram como a temperatura e a UR podem controlar a liberação dos OEs de palmarosa e anis estrelado a partir das β -CD. Tal liberação controlada já foi reportada para outros *guest* encapsulados em β -CD (Almenar et al., 2007a; Almenar, Auras, Rubino e Harte, 2007b; Joo et al., 2012; Kfoury et al., 2015; Merkel, Joo, Rai, Ryser e Almenar, 2011; e Zhang et al., 2015).

Ademais, estes resultados corroboram com o fato de que o toro esterico das β -CD atua como uma barreira capaz de proteger ou mesmo conter a evaporação de compostos voláteis, além de modular a sua liberação de acordo com as condições ambientais (Mazzobre, dos Santos e Buera, 2011; Wang et al., 2011; dos Santos, Buera e Mazzobre, 2012; Zhang et al., 2015).

2. Conclusão

A eficiência de aprisionamento ou encapsulamento das β -CD é muito afetada por diversos fatores, como a quantidade de água intramolecular existente nas β -CD, a ordem de adição em que os OEs e as β -CD são colocados em solução, o tipo de OE utilizado, a concentração dos OEs utilizados, o processo de secagem final dos ICs obtidos, além dos solventes utilizados na sua recuperação. Diferentes valores de EA podem ser obtidos dependendo das modificações realizadas nos fatores listados acima, e, assim, valores imprecisos podem ser reportados se isto não for levado em consideração.

A secagem das β -CD por 30 minutos, a adição das β -CD em água antes dos OEs, a secagem dos ICs em estufa, além da determinação da concentração dos OEs e dos solventes mais adequados para a

recuperação dos OEs, são fatores que podem ser utilizados para otimizar a EA das β -CD. Além disso, um ponto crítico a se considerar para a determinação da concentração dos EOs e dos solventes é a composição química dos OEs. A composição química pode ainda afetar as propriedades térmicas e físico-químicas dos ICs formados.

Finalmente, os OEs aprisionados/encapsulados podem ser liberados dos ICs formados em níveis específicos desejados, manipulando-se tanto temperatura como UR.

CAPÍTULO 4 – EMBALAGENS BIOATIVAS DE FUNDO DUPLO CONTENDO COMPLEXOS DE INCLUSÃO FORMADOS POR β -CICLODEXTRINAS-PALMAROSA/ANIS ESTRELADO PARA O ARMAZENAMENTO DE MAÇÃS

Uma vez otimizados os processos de encapsulamento dos óleos essenciais (OEs) em β -ciclodextrinas (β -CD), assim como determinados os fatores que influenciam na sua cinética de liberação ao ambiente, o presente capítulo teve por objetivo utilizar os complexos de inclusão (ICs) obtidos no capítulo anterior (capítulo 3) contra o fungo *P. expansum in vitro*, e também na proteção dos frutos de maçã contra esta fitopatôgeno *in situ*. Tal objetivo (capítulo) visou o desenvolvimento de um protótipo de embalagem bioativa de funcionalidade comercial, capaz de controlar o fungo *P. expansum* em frutos de maçã nos diferentes cenários ambientais, isto é, com diferentes temperaturas e umidades relativas, sem comprometer as propriedades físico-químicas dos frutos.

1. Introdução

A maçã (*Malus domestica* Borkh.) é um dos frutos cultivados de maior importância econômica no mundo (FAO, 2017). Os frutos podem ser armazenados em câmaras frias para aumentar o seu tempo de prateleira e permitir sua distribuição durante o ano (Morales et al., 2010). No entanto, tal armazenamento não é o suficiente para prevenir o aparecimento de doenças nos frutos, como o bolor azul causado por *Penicillium expansum*, servindo apenas para retardar o seu crescimento e desenvolvimento (Baert et al., 2007).

Neste sentido, apesar da utilização de fungicidas convencionais, o bolor azul continua sendo o principal problema no armazenamento de maçãs em todo o mundo (Buron-Moles et al., 2012). A mudança dos paradigmas e expectativas dos consumidores somados à constante utilização de poucas classes de princípios ativos presentes nos fungicidas, tem levado ao desenvolvimento de novas estratégias de controle ecologicamente amigáveis, e que possam ser utilizadas comercialmente (da Rocha Neto et al., 2016; Hac-Wydro et al., 2017).

Uma alternativa parece residir na utilização dos óleos essenciais (OEs), devido às suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes e antigenotóxicas (Hu et al., 2017; Sinha et al., 2011; Sung et al., 2012), sendo classificados como *GRAS* (*Generally Recognized As Safe*) pelo FDA e permitidos na agricultura orgânica (Goñi et al., 2009; Hu et al., 2017).

Entretanto, uma limitação ao uso dos OEs diretamente nos alimentos reside em seus fortes aromas, alta volatilização e oxidação, o que pode resultar em perdas na eficiência biológica e causar modificações nas características organolépticas e físico-químicas dos alimentos (Ribeiro-Santos et al., 2017). Para superar tais problemas, diversas técnicas têm sido desenvolvidas, tais como embalagens bioativas, a complexação do OEs em ciclodextrinas (Almenar et al., 2007; Kfoury et al., 2015), em revestimentos (Guerreiro et al., 2015; Perdonés et al., 2016), (bio)filmes (Ramos et al., 2014; Wen et al., 2016), (nano)fibras (Kayaci et al., 2014), dentre outros.

Com isto, os objetivos do presente capítulo foram: (1) avaliar os efeitos antifúngicos dos complexos de inclusão (ICs) formados entre os OEs e as β -ciclodextrinas *in vitro* contra *P. expansum*; (2) desenvolver um protótipo de embalagem bioativa associada aos ICs obtidos capaz de controlar o desenvolvimento do bolor azul *in situ*, e (3) elucidar os efeitos físico-químicos dos ICs obtidos nos frutos de maçã.

2. Material e Métodos

2.1. Materiais

2.1.1. Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OEs) de palmarosa e anis estrelado foram adquiridos da empresa By Samia (São Paulo, Brasil), sendo extraídos por destilação a vapor, e caracterizados por cromatografia gasosa (HP 6890, Agilent Technology, Califórnia, EUA) acoplada à espectroscopia de massas (Pegasus III, LECO Corp., Michigan, EUA). Os resultados podem ser encontrados por completo em <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.029>.

2.1.2. β -ciclodextrinas e demais reagentes

As β -ciclodextrinas (β -CD) foram adquiridas da empresa Wacker Chemical (Michigan, EUA). Todos os demais reagentes de grau analítico utilizados no estudo foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (Missouri, EUA).

2.1.3. Frutos de maçã e fitopatógeno

Os frutos de maçã cv. Red Delicious foram adquiridos, selecionados, padronizados e armazenados a $6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ na Michigan State University (Michigan, EUA), antes de sua utilização. As maçãs foram desinfetadas por 2 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % (v/v), lavadas com água corrente, e secas dentro de uma cabine de biossegurança (Class II BSC, ESCO, Tampines, Singapura) antes de serem utilizadas nos experimentos.

Já o fungo *P. expansum* foi isolado de um fruto de maçã com sintomas característicos do bolor azul, identificado de acordo com suas características morfológicas, e crescido em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), a $23\text{ }^{\circ}\text{C}$, por duas semanas. Para os experimentos, após 14 dias, os conídios foram coletados, adicionados à água destilada estéril, e a suspensão de conídios ajustada à concentração desejada com o auxílio de um hemacitômetro. Para os experimentos *in vitro*, a concentração utilizada foi de 1×10^5 conídios/mL, ao passo que para os experimentos *in situ*, a concentração utilizada foi de 1×10^4 conídios/mL.

Todos os experimentos *in vitro* ou *in situ* foram montados dentro da cabine de segurança de modo a se evitar possíveis contaminações.

2.2. Preparo dos complexos de inclusão, eficiência de aprisionamento e caracterização

As metodologias pelas quais os complexos de inclusão (ICs) com os óleos essenciais de palmarosa (ICP) e anis estrelado (ICsa) foram obtidos, assim como o método para determinação da eficiência de aprisionamento/encapsulamento (EA) dos complexos formados, foram descritos e podem ser encontradas em <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.029>.

Além disso, as β -CDs, os OEs e os ICs foram caracterizados por meio de espectroscopia de Raman, utilizando o equipamento RXN1 (Kaiser Optical Systems, Michigan, EUA), equipado com um laser a 785 nm e uma sonda de fibra óptica de não-contato (para fase sólida) ou de contato (para fase líquida). Todos os espectros coletados possuíam uma intensidade máxima entre 30 a 40 mil contagens, resolução de 4 cm^{-1} , e foram coletados entre 200 a 3400 cm^{-1} . O software HoloReact™ (Kaiser Optical Systems, Michigan, EUA) foi utilizado na curva de resolução multivariada para plotar as mudanças observadas nas características espectrais existentes correlacionadas às β -CD, os OEs, e os ICs.

2.3. Ensaio biológicos

2.3.1. Determinação do potencial antimicrobiano *in vitro* dos ICs contra *P. expansum*

Os efeitos inibitórios dos ICs contra o fungo *P. expansum* foram realizados em frascos de vidro de 250 mL. Para tanto, adicionaram-se 10 mL de BDA aos frascos deixando-se solidificar sob temperatura ambiente. Posteriormente, 25 μ L de uma suspensão de conídios de *P. expansum* (10^5 conídios/mL) foram colocados no centro dos frascos, diretamente no meio de cultura. Na extremidade do meio de cultura, um pequeno cadinho de alumínio contendo 350 mg de um IC também fora colocado. Os frascos de vidro foram imediatamente fechados com tampas modificadas e lubrificante para alto vácuo, seladas com parafilme, e incubados durante 5 dias em uma cabine de temperatura controlada a 23 °C (PTC-1, Sable System, Nevada, EUA).

Frascos contendo apenas BDA, ou BDA e *P. expansum*, ou *P. expansum* e apenas as β -CDs foram utilizados como controle. Ademais, a quantidade de um IC utilizado foi determinada baseando-se nos resultados obtidos com os óleos essenciais *in vitro* apresentados no capítulo 2 desta tese, isto é 125 ppm (anis estrelado) ou 250 ppm (palmarosa). A avaliação do experimento ocorreu diariamente, durante 5 dias, a partir da medição do diâmetro da colônia formada por *P. expansum*, sem a abertura dos frascos, e os resultados expressos em cm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Em adição, para mensurar a liberação dos OEs a partir dos ICs no *headspace* e também a viabilidade das colônias de *P. expansum* formadas nos frascos de vidro, uma “rolha” plástica (20 mm) foi fortemente inserida nas tampas de alumínio dos frascos de vidro anteriormente aos experimentos serem conduzidos, e seladas com lubrificante de vácuo extremo.

A liberação dos OEs a partir dos ICs para o *headspace* dos frascos de vidro foi mensurada diariamente, durante 5 dias, utilizando-se a metodologia descrita em <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.029>.

Além disso, a viabilidade do *P. expansum* foi confirmada a partir da atividade respiratória, calculando-se a proporção de O₂/CO₂ no *headspace* dos frascos de vidro por meio de cromatografia gasosa acoplada a um detector de condutividade térmica (Trace GC Ultra,

Thermo Scientific, Flórida, EUA), equipado com uma coluna Zebron ZB-1 (30 m X 0,32 mm X 0,25 μm ; Phenomenex, Califórnia, EUA), seguindo a metodologia proposta por Koutsimanis, Harte e Almenar (2014), com modificações.

Para o estudo de viabilidade, um total de 50 μL do gás existente no *headspace* foi coletado de cada frasco de vidro utilizando-se uma seringa SGE (Supelco Analytical, Califórnia, EUA), e imediatamente injetado na porta de *split* do GC. A temperatura inicial do *oven* foi ajustada para 45 $^{\circ}\text{C}$ por 4 minutos, com um primeiro aumento para 190 $^{\circ}\text{C}$ a uma razão de 60 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, durante 1 minuto e meio, e novamente aumentada para 230 $^{\circ}\text{C}$, a uma razão de 120 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, durante 1 minuto. A temperatura do injetor foi fixada em 125 $^{\circ}\text{C}$, com uma taxa de *split* e razão de 150 mL/min e 30, respectivamente. A condutividade térmica do bloco condutor foi fixada em 200 $^{\circ}\text{C}$, ao passo que a temperatura de transferência foi estabelecida em 190 $^{\circ}\text{C}$. O GC foi previamente calibrado utilizando-se quantidades conhecidas dos gases estudados, e também de suas misturas (Airgas USA, Great Lakes, Ohio, EUA), e os resultados expressos em percentagem de O_2 e CO_2 .

2.3.2. Desenvolvimento das embalagens de fundo duplo e determinação *in situ* do seu potencial antimicrobiano contra *P. expansum*

Antes do desenvolvimento da embalagem de fundo duplo, um experimento foi realizado com células de permeação cilíndricas feitas de alumínio (10,8 cm de diâmetro e 1,0 cm de profundidade) de modo a se determinar o tipo de material a ser utilizado nas embalagens, evitando-se a volatilização dos compostos dos OEs para o exterior.

As embalagens foram desenvolvidas utilizando containers de plástico rígido de PET (polietileno tereftalato) com 7 cm de largura/profundidade, e 10 cm de altura, com um segundo fundo feito também de PET. Em cada um dos suportes adicionados como novos “fundos” foram feitos 90 micro perfurações (0,06 μm de diâmetro) para permitir a volatilização dos compostos dentro da embalagem (Figura 4.1).

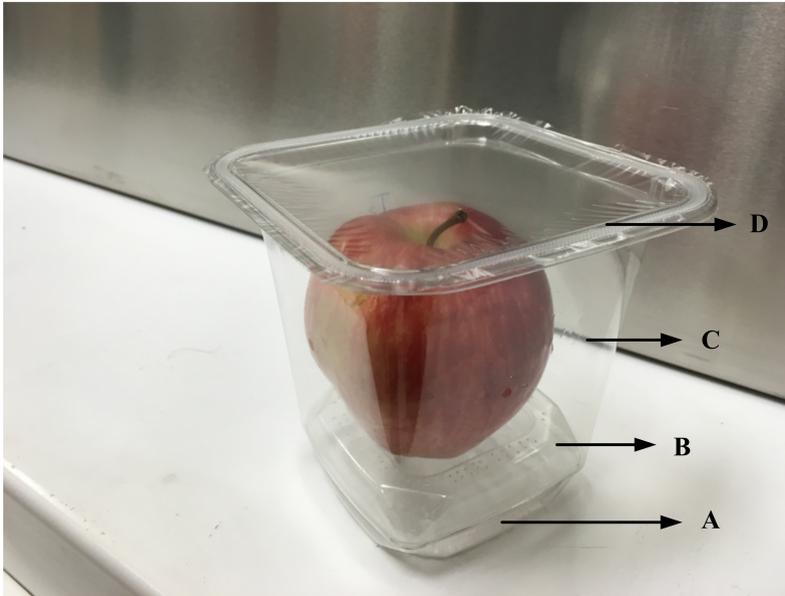


Figura 4.1. Protótipo da embalagem de fundo duplo utilizada para manter a sanidade de frutos de maçã contra *Penicillium expansum*. Câmara base para deposição dos complexos de inclusão (ICs) (A), coberta por um novo fundo base (fundo duplo), contendo 90 micro perfurações, para suporte das maçãs (B) no ambiente (C), selados com filme de polietileno tereftalato (PET) (D).

Os ensaios antimicrobianos *in situ* contra *P. expansum* foram realizados com as embalagens desenvolvidas. Os frutos de maçã cv. Red Delicious foram feridos na região equatorial com uma agulha padronizada (1mm x 5 mm) e imersos por 2 minutos em uma suspensão de *P. expansum* (1×10^4 conídios/mL) preparada em água destilada. As maçãs foram imediatamente colocadas dentro das embalagens que continham 1g de β -CD, ou 1 g de ICp, ou 0,5g de ICsa. Tais quantidades dos ICs foram estabelecidas com base nos experimentos realizados *in vitro*. Por sua vez, as embalagens contendo as maçãs e os compostos foram imediatamente seladas com calor utilizando filmes de PET em um equipamento de selagem de bandejas semiautomático T200 (MultiVac, Wolfertschwenden, Alemanha). Finalmente, as embalagens foram mantidas a 25 °C, à umidade relativa proferida pelos frutos de maçã, em escuro, durante todo o período experimental. Foram realizadas 15 repetições por tratamento, onde uma única embalagem contendo um fruto com dois ferimentos foi considerada uma repetição.

A velocidade de crescimento da lesão (VCL) foi determinada de acordo com o proposto por da Rocha Neto, Maraschin e Di Piero (2015), medindo-se o diâmetro da lesão (cm) com o auxílio de uma régua padronizada em cada uma das maçãs, a cada 4 dias, por 12 dias. A velocidade de crescimento da lesão foi então calculada a partir da média do diâmetro das lesões durante o tempo de incubação, dada pela fórmula:

$$VCL = \Sigma (\theta_t - \theta_{t-1}) / t$$

Onde “ θ ” indica o diâmetro da lesão em um determinado tempo “ t ”. Os resultados finais foram expressos em cm/dia. Além disso, a incidência ao final do experimento também foi calculada a partir da divisão do número de lesões que apresentaram lesões características do bolor azul pelo número total de lesões feitas, e os resultados expressos em %.

Em adição, a liberação dos compostos a partir dos ICs colocados no fundo das embalagens foi quantificada utilizando-se a metodologia encontrada em <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.029>.

A produção de etileno e a composição de O₂ e CO₂ no interior das embalagens também foram determinadas. Em termos de produção de etileno, um total de 100 μ L do *headspace* foi coletado de cada embalagem, utilizando-se uma seringa SGE específica para a amostragem de compostos gasosos, e injetado imediatamente na porta *splitless* do GC HP 6890, equipado com o FID. A temperatura do *oven* foi determinada em 150 °C por 8 minutos, e a temperatura do injetor em 220 °C, com um fluxo *splitless* de 2,0. A concentração de etileno foi quantificada a partir de curvas padrões, previamente preparadas, sendo expressas em ppm. Ademais, a taxa respiratória (O₂ e CO₂) dos frutos inoculados ou não, e tratados ou não, foram quantificadas conforme descrito no item 2.3.1.

2.3.3. Análises físico-químicas dos frutos de maçã

A partir dos experimentos descritos no item 2.3.2, cada um dos frutos de maçã foi coletado após as análises cromatográficas supracitadas para a realização das análises físico-químicas em cada tempo amostral (0, 4, 8 ou 12 dias).

A perda de massa dos frutos (PM) foi quantificada a partir da pesagem individual de cada um dos frutos, utilizando uma balança

analítica digital Discovery DV314C (Ohaus, New Jersey, EUA), e os valores reportados como percentagem de perda de massa. Por sua vez, a firmeza dos frutos (FF) foi medida utilizando-se um penetrometro de frutos (Wagner FT Series, Connecticut, EUA), e os resultados expressos em kg/cm^2 .

Após as análises de PM e FF, todos os frutos foram cortados em 4 pedaços iguais, e batidos em liquidificador por 30 segundos para se obter o extrato bruto. Os extratos foram mantidos em gelo para diminuir a ação enzimática e reduzir a oxidação. O pH dos extratos foi mensurado utilizando-se um medidor de pH/ions SevenCompact S220 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suíça). Por sua vez, a acidez titulável (AT) dos extratos obtidos foram determinadas a partir da titulação com 0,1 mol/L de NaOH até o pH final de 8,2, utilizando o medidor de pH/ions SevenCompact S220. Os resultados foram expressos em mg de ácido málico por 100 mL de suco (extrato).

Finalmente, os sólidos solúveis totais (SST) dos extratos obtidos foram determinados utilizando-se o refractômetro portátil Atago PAL-1 (Washington, EUA), e os resultados expressos em °Brix.

2.4. Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em um delineamento completamente casualizado, em triplicatas, e todos os resultados expressos como médias \pm desvios padrões. Os dados foram submetidos aos testes de Levene ou Cochran para se verificar a homogeneidade das variâncias dos tratamentos (análise fatorial ou *one-way* ANOVA). Quando a ANOVA foi significativa ($p < 0,05$), as médias foram separadas a partir do teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software STATISTICA 10.0 ou SAS University Edition, e os gráficos resultantes plotados no Prism Software for Mac OS Sierra.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização dos OEs

Os resultados obtidos a partir das análises realizadas por GC-MS foram apresentadas e discutidas na íntegra em <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.029>.

3.2. Eficiência de aprisionamento (EA) e espectroscopia de Raman

Os compostos dos OEs de palmarosa e anis estrelado possuem diferentes capacidades de interação com as β -CD e, dessa forma, apresentaram diferentes EAs. Tais resultados foram previamente apresentados e discutidos na íntegra em <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.029>.

A espectroscopia de Raman foi utilizada para confirmar a EA dos EOs nas β -CD a partir da comparação dos espectros obtidos (posição e intensidade dos picos) das β -CD, dos ICs (ICp e ICsa), e dos OEs (Figura 4.2). Os resultados apresentados na Figura 4.2 do presente capítulo estão em acordo com os resultados obtidos por Egyed (1990) e Mohan, Sreelakshmi, Muraleedharan e Joseph (2012), onde foi observado que as bandas de Raman das β -CD são dadas a partir das vibrações dos esqueletos de C-C-H, do C-C-H aromático, e do estiramento de C=C, correspondendo a um pico acentuado em 480 cm^{-1} , por um pico alongado em 860 cm^{-1} associados à flexão de C-C-H e C-O e do estiramento de C-C, e também devido às vibrações dos esqueletos de carbono que envolvem as ligações do tipo α -1,4, associadas ao pico em 950 cm^{-1} .

Outros picos específicos (*fingerprint*) das β -CD foram observados nas regiões entre $1000\text{-}1200$ e de $1300\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, sendo relacionados ao estiramento de C-C e C-O, às flexões de O-C-H, C-C-H e C-C-O, também às flexões de C-C-H, C-O-H, O-C-H e H-C-H, respectivamente. Além disso, um pico alongado foi observado na região de $2855\text{-}3040\text{ cm}^{-1}$, sendo atribuído às vibrações de estiramento dos grupamentos O-H primários e secundários. Em adição, não foram observados picos na região de entre $1550\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$, relacionados ao estiramento de carbonil, comum a outras diversas classes de compostos orgânicos, estando de acordo com Veiga, Teixeira-Dias, Kedzierewicz, Souza e Maincent (1996).

Os OEs também foram caracterizados por espectroscopia de Raman, a partir da comparação entre as regiões de *fingerprint* dos compostos, conforme Huang (2016). O espectro Raman do OE de palmarosa (Figura 4.2A) mostrou um largo pico em 1025 cm^{-1} , associado ao estiramento de C-C-O, comumente observado em derivados de álcoois monoterpênóides primários (Schulz e Baranska, 2007), tais como o geraniol. Foram observados também picos acentuados em 1335 , 1385 , 1450 e 2745 cm^{-1} , relacionados a deformação e flexão de CH_2 , e da vibração ocasionada pela flexão *in-plane* de CH_3 . Além disso, o pico de maior intensidade foi observado

em 1675 cm^{-1} devido às vibrações de estiramento das ligações C=C. Estes resultados são similares aos encontrados por Baranska et al. (2005), Schulz, Schrader, Quilitzsch, Pfeffer e Krüger (2003), Schulz e Baranska (2007) e também no catálogo online disponibilizado pela empresa Sigma-Aldrich (2017), relacionados aos compostos principais do OE de palmarosa.

De modo similar, o espectro de Raman do OE de anis estrelado (Figura 4.2B) apresentou diversos picos relacionados aos principais compostos do OE. Picos de baixa intensidade foram observados em 645, 790, 830, 850 e 1460 cm^{-1} , relacionados à deformação do anel benzênico, à agitação de C-H, e da substituição do tipo *para* no anel benzênico. Cinco picos de média intensidade foram observados em 1175, 1210, 1285, 1310 e 2920 cm^{-1} , também relacionados às substituições do tipo *para* no anel benzênico, à curvatura no plano de C-H, do estiramento e curvatura no plano de C-C, e do estiramento em CH_3 . Finalmente, dois picos de alta intensidade foram observados em 1610 e 1655 cm^{-1} , sendo característicos da ligação dupla existente entre C=C na cadeia lateral de *trans*-anetol e estragol, estando de acordo com Gudi, Krahmer, Kruger, Hennig e Schulz (2014), Daferera, Tarantilis e Polissiou (2002), Sinha et al. (2014) e Strehle, Rösch, Berg, Schulz e Popp (2006).

Em relação aos ICs (ICp e ICsa), grande parte dos picos observados anteriormente nos respectivos OEs não foram encontrados, sendo observados diversos picos relacionados às β -CD (Figura 4.2). Apenas 2 picos foram observados em 1465 e 1680 cm^{-1} no ICp, relacionados aos principais compostos do OE de palmarosa, isto é, o geraniol (Figura 4.2A), ao passo que 5 picos foram observados no ICsa, nas posições de 788, 1178, 1250, 1610 e 1658 cm^{-1} , relativos aos compostos *trans*-anetol e estragol (Figura 4.2B).

Deste modo, a significativa ausência de picos relativos aos OEs, associado à presença de picos relacionados às β -CD, indicam que aproximadamente todos os compostos de ambos OEs foram aprisionados com êxito na cavidade das β -CD.

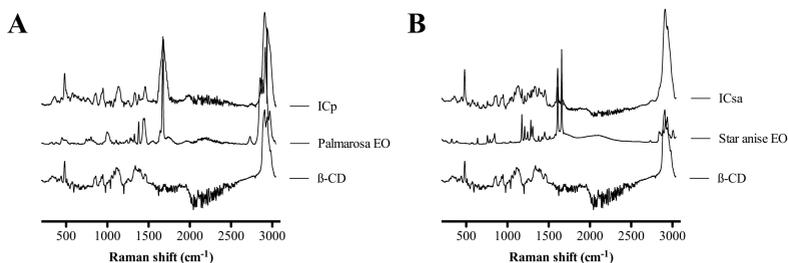


Figura 4.2. Espectro da espectroscopia de Raman referente às β -ciclodextrinas (β -CD), complexo de inclusão de palmarosa (ICp) e do óleo essencial (OE) de palmarosa (A), e das β -CD, complexo de inclusão de anis estrelado (ICsa) e do OE de anis estrelado.

3.3. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos ICs contra o fungo *P. expansum*

A atividade antimicrobiana dos ICs de palmarosa e anis estrelado a partir da liberação dos OEs das β -CD (como voláteis) contra o fungo *P. expansum* é observada na Tabela 4.1. O ICp inibiu completamente o crescimento do *P. expansum* nas primeiras 48h, liberando cerca de 70 ppm do OE de palmarosa para o headspace do frasco de vidro (dados não mostrados). A liberação dos compostos do OE de palmarosa aumentou após 120h, chegando a um total de 140 ppm, inibindo o crescimento do fungo a 0,53 cm até o final do experimento (Tabela 4.1).

Resultados semelhantes foram encontrados por Wilson, Solar, Ghaouth e Scientist (1997), que observaram o efeito antimicrobiano do OE de palmarosa contra conídios de *Botrytis cinerea in vitro*, por Nguefack et al. (2009) e Nguefack et al. (2012) que utilizaram o OE de plantas do gênero *Cymbopogon* e suas frações contra *P. expansum* à uma concentração mínima de 1000 ppm, resultando na completa inibição da germinação do bolor azul, e também por Frankova et al. (2016), que utilizaram o método por volatilização em disco e de circulação de ar quente associado ao OE de *Cymbopogon citratus* para inibir diferentes bolores, como *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *B. cinerea*, *P. expansum* e *P. digitatum*, às concentrações de 256, 512, 128, >512 e >512, respectivamente.

De modo semelhante, o ICsa inibiu completamente o crescimento do fungo nas primeiras 48h, liberando metade da

concentração do OE de anis estrelado em comparação à liberação do OE de palmarosa (dados não mostrados), chegando a um máximo de 70 ppm após 120h de incubação, reduzindo o desenvolvimento do fungo durante todo o período experimental (Tabela 4.1). Comparativamente, Huang et al. (2010) observaram que a IC₅₀ em fase de vapor do trans-anetol, principais compostos do OE de anis estrelado, no crescimento micelial de *Alternaria solani*, *Fusarium graminearum* e *Rhizoctonia solani* foi de 90, 80 e 80 ppm, respectivamente.

Em adição, as análises de GC revelaram que os níveis de O₂ e de CO₂, que indicam a atividade respiratória das colônias, foram mantidos quase sem nenhuma alteração durante todo o período experimental quando os ICs foram utilizados (Tabela 4.1).

Por outro lado, quando o fungo *P. expansum* foi exposto às β-CDs ou apenas mantidos em meio de cultura (sem a presença dos outros compostos), o diâmetro máximo das colônias foi de 3,9 cm, diferindo estatisticamente dos outros tratamentos (Tabela 4.1). Além disso, as β-CD não interferiram na liberação ou absorção de compostos voláteis e, assim, uma alta atividade respiratória das colônias foi observada, isto é, alto consumo de O₂ e alta produção de CO₂, sendo observado um decaimento de aproximadamente 24 ppm para 6 ppm de O₂ e um aumento de aproximadamente 0 ppm para 16 ppm de CO₂ após 120h de incubação (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Diâmetro das colônias de *Penicillium expansum* em meio de cultura (BDA), expostos às β -ciclodextrinas (β -CD), complexos de inclusão (ICs) de palmarosa (ICp) ou anis estrelado (ICsa), ou não, por até 120h, com a liberação controlada dos compostos dos óleos essenciais (OEs) de palmarosa e anis estrelado dos ICs para o *headspace*, e seus efeitos relativos ao consumo de oxigênio (O₂), e produção de dióxido de carbono (CO₂) pelo fungo.

Tratamentos	Tempo (horas)		
	0	3	6
Danos na Membrana Plasmática			
Unidades Relativas de Absorbância (x10000)			
Água	16,00 ± 0,79	11,66 ± 3,30 C	15,52 ± 0,82 C
Melaleuca	16,00 ± 0,79	13,76 ± 0,15 C	21,63 ± 0,41 B
Palmarosa	16,00 ± 0,79	17,56 ± 0,72 B	29,05 ± 4,25 A
Anis estrelado	16,00 ± 0,79	20,73 ± 0,85 A	29,33 ± 1,52 A
TBARS			
pmol de TBARS / grama de proteínas			
Água	0,99 ± 0,08	1,61 ± 0,50 B	1,23 ± 0,43 D
Melaleuca	0,99 ± 0,08	2,77 ± 0,49 B	4,53 ± 0,71 C
Palmarosa	0,99 ± 0,08	2,20 ± 0,60 B	5,87 ± 0,47 B
Anis estrelado	0,99 ± 0,08	5,87 ± 0,47 A	7,72 ± 0,29 A
Extravasamento de DNA			
ng de DNA / grama de micélio			
Água	0	11,50 ± 2,30 A	13,15 ± 1,34 D
Melaleuca	0	14,63 ± 0,38 B	19,63 ± 2,63 C
Palmarosa	0	18,65 ± 0,42 B	31,68 ± 3,80 B
Anis estrelado	0	47,49 ± 19,66 C	69,28 ± 5,31 A
Extravasamento de Proteínas			
µg de proteína / grama de micélio			
Água	5,38 ± 4,21	10,54 ± 0,09 C	10,96 ± 0,70 D
Melaleuca	5,38 ± 4,21	16,72 ± 1,13 B	18,68 ± 0,62 B
Palmarosa	5,38 ± 4,21	12,33 ± 1,50 C	14,61 ± 1,77 C
Anis estrelado	5,38 ± 4,21	34,72 ± 11,53 A	39,29 ± 12,64 A
Extravasamento de Açúcares			
mg de glicose / grama de micélio			
Água	1,24 ± 0,05	1,81 ± 0,10 C	1,64 ± 0,05 D
Melaleuca	1,24 ± 0,05	3,89 ± 0,32 A	5,78 ± 0,29 A
Palmarosa	1,24 ± 0,05	2,07 ± 0,11 B	2,40 ± 0,21 C
Anis estrelado	1,24 ± 0,05	2,29 ± 0,12 B	3,00 ± 0,01 B

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.4. Atividade antimicrobiana *in situ* das embalagens de fundo duplo associados aos ICs contra o fungo *P. expansum*

O experimento de permeação realizado com os OEs de palmarosa e anis estrelado revelou que o plástico PET, dentre os plásticos testados, foi o mais adequado para reter os OEs dentro das células de permeação durante o período experimental (dados não mostrados). Com isto, o protótipo de embalagem de fundo duplo

associada aos ICs utilizado nos experimentos foi feito com PET (Figura 4.1).

A atividade antimicrobiana *in situ* dos ICp e ICsa a partir da liberação dos OEs das cavidades das β -CD dentro das embalagens de fundo duplo contra o fungo *P. expansum* é dada nas Figuras 4.3A e B. Após 12 dias de incubação, as maçãs inoculadas com o fungo, e que continham os ICs no fundo da embalagem, apresentaram uma VCL de 0,09 cm/dia, resultando em um diâmetro final de lesão de 1,08 cm, diferindo das maçãs inoculadas apenas com *P. expansum* ou expostas às β -CD, cuja VCL foi de 0,23 e 0,12 cm/dia, respectivamente, resultando em um diâmetro final da lesão aproximadamente 2 vezes maior do aqueles observados para as embalagens que continham os ICs (Figura 4.3A e B). Em termos de incidência, nenhuma diferença foi observada entre os tratamentos (Figura 4.3A).

Estes resultados podem estar relacionados ao fato de que apenas após o 4º dia de incubação é que se detectou a presença dos compostos voláteis dos ICs no local onde as maçãs foram colocadas (Figura 4.3C), chegando a um máximo de 2,1 e 33,65 ppm para palmarosa e anis estrelado, respectivamente, sem alcançar a concentração mínima necessária para inibir completamente o crescimento e desenvolvimento do bolor azul após os 12 dias de incubação (Figura 4.3C), conforme determinado anteriormente *in vitro* (Tabela 4.3).

Frankova et al. (2016) ao utilizarem a fase de vapor dos OEs de cravo, orégano e canela a 16 ppm, observaram apenas uma inibição parcial dos crescimento e desenvolvimento do bolor azul em maçãs, com um diâmetro de lesão de 3,09, 1,84 e 2,53 cm, respectivamente, ao final de 21 dias de incubação. De modo similar, Stojkovic et al. (2011) observaram uma diminuição significativa na incidência de *A. niger* em frutos de maçã tratados com o composto volátil 1,8 cineole, com uma inibição total do fungo quando o composto foi utilizado à uma concentração maior ou igual a 3%.

Em adição, tanto a respiração quanto a produção de etileno dos frutos foi afetada pelos tratamentos utilizados, isto é, β -CD, ICp ou ICsa (Figuras 4.3D e F). As embalagens em que os frutos de maçã foram inoculados com o fungo, sem a adição das β -CD ou dos ICs, apresentou um aumento na produção de CO₂ após os 12 dias de incubação, ao passo que todas as embalagens que continham os frutos e os tratamentos (β -CD, ICp e ICsa) mantiveram os níveis de CO₂ similares àqueles encontrados nos frutos não inoculados com o fitopatógeno (Figura 4.3E). No entanto, os níveis de O₂ das embalagens contendo os frutos e

os tratamentos foram similares àqueles observados nas embalagens em que as maçãs foram inoculadas (Figura 4.3F), muito provavelmente devido à atividade do bolor azul (Figura 4.3A).

Além disso, os níveis de etileno foram significativamente menores nas embalagens que continham os ICs em relação àquelas que continham os frutos inoculados com o bolor azul, sem a presença dos tratamentos (Figura 4.3D). Nenhuma diferença estatística foi observada entre as embalagens que continham β -CD ou os ICs das que continham apenas as maçãs não inoculadas após 8 dias de incubação, diferindo significativamente daquelas inoculadas com *P. expansum*. Após 12 dias, os níveis de etileno foram mantidos nas embalagens que continham as maçãs não inoculadas e o ICsa (0,01 ppm), ao passo que um aumento de 2 a 4 vezes foi observada nos tratamentos com ICp (0,02 ppm) e β -CD (0,04 ppm), respectivamente (Figura 4.3D).

De modo contrário, Moscetti et al. (2013) observaram um aumento significativo nos níveis de etileno quando a quercetina foi utilizada *in situ* em frutos de maçã, aumentando a atividade respiratória dos mesmos. No entanto, em ambos os casos, tal efeito foi observado após 30 dias de incubação a 2 °C, diferindo completamente das condições utilizadas em nosso estudo. Ademais, a classificação química das moléculas também deve ser levada em consideração, uma vez que a quercetina é um flavonóide polifenólico, ao passo que o principal composto do OE de palmarosa é classificado quimicamente como um álcool monoterpênico, e o principal composto do OE de anis estrelado é classificado como um éter aromático não saturado, conforme descrito anteriormente.

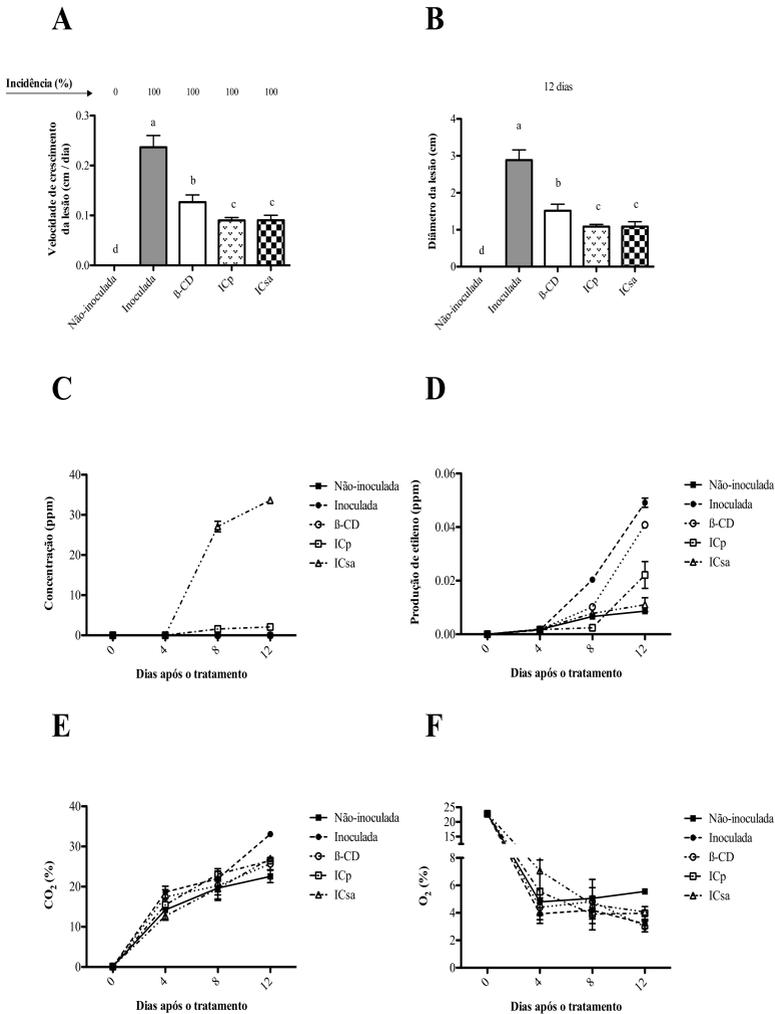


Figura 4.3. Velocidade de crescimento da lesão de *Penicillium expansum* (A), e o diâmetro final da lesão (B) ocasionada pelo fungo em frutos de maçã expostos às diferentes concentrações de β-ciclodextrinas (β-CD), ou aos complexos de inclusão de palmarosa (ICp) ou anis estrelado (ICsa) (C) ao longo do período experimental de armazenamento, e os efeitos destes na síntese de etileno (D), e no consumo de dióxido de carbono (CO₂) (E), e oxigênio (O₂) (F).

3.4.1. Análises físico-químicas dos frutos de maçã

A perda de massa (PM) dos frutos de maçã armazenados nas embalagens desenvolvidas contendo β -CD, ICp e ICsa foram notavelmente afetadas pelos tratamentos (Tabela 4.2). A PM dos frutos inoculados com o bolor azul e armazenados em embalagens sem nenhum tratamento ou contendo β -CD foi de 24,3 e 23,7%, respectivamente, ao final de 8 dias de incubação, alcançando um máximo de 24,5% ao final do período experimental, ao passo que uma PM menor que 10,3 e 12,4% foi observada nas maçãs armazenadas nas embalagens que continham ICp e ICsa, respectivamente, ao final de 8 dias de incubação, e de 19,6 e 18,5%, ao final do período experimental (Tabela 4.2).

Os sólidos solúveis totais (SST) das maçãs armazenadas nas embalagens contendo os ICs também foi preservada, isto é, de 12,8 °Brix no início do experimento, e de 13,2 °Brix após 12 dias de incubação. Por outro lado, maçãs inoculadas e embaladas com a presença de β -CD ou sem nenhum tratamento, apresentaram uma SST de aproximadamente 14,3 °Brix ao final do experimento (Tabela 4.2).

A manutenção da PM e da SST nos frutos armazenados nas embalagens contendo os ICs podem ser relacionadas a dois diferentes fatores, a saber: (1) devido às suas propriedades antimicrobianas; e (2) devido às suas atividades na via de produção do etileno. Conforme demonstrado anteriormente, ICp e ICsa foram capazes de diminuir a VCL e, conseqüentemente, diminuíram também o diâmetro final da lesão do bolor azul nos frutos de maçã (Figura 4.3A e B). Assim, com o desenvolvimento do fungo reduzido ou mesmo impedido, o catabolismo dos açúcares presentes nos frutos a partir da ação de enzimas como as α -amilases e pectinases do fungo, não ocorreu de modo expressivo, contribuindo para a manutenção de tais parâmetros nos frutos (da Rocha Neto et al., 2016).

Em relação ao etileno, também foi demonstrado que os ICp e ICsa foram capazes de prevenir a sua síntese pelos frutos (Figura 4.3D). Neste sentido, pode-se hipotetizar que os OEs liberados a partir das β -CD foram capazes de interagir com os tecidos da casca dos frutos, ligando-se aos receptores e prevenindo a expressão de genes relacionados à biossíntese de etileno, sendo similar aos efeitos observados quando o 1-MCP é utilizado, prevenindo a aceleração do amadurecimento dos frutos e sua senescência devido aos efeitos do etileno nos frutos, o que levaria a um aumento na PM e na SST das maçãs (Li et al., 2017; Yang et al., 2016).

Em relação à acidez titulável (AT) e o pH, os frutos armazenados nas embalagens contendo ICsa apresentaram respostas metabólicas similares àqueles frutos não inoculados e não tratados, durante todo o período experimental, ao passo que em frutos colocados em embalagens contendo ICp, tais respostas foram observadas de forma similar durante os primeiros 8 dias (Tabela 4.2). Quando os frutos foram apenas inoculados ou inoculados e armazenados com β -CD, o *P. expansum* foi capaz de acidificar os tecidos a partir do 4º dia, diminuindo o pH tecidual dos frutos de maçã (Tabela 4.2), provavelmente devido à secreção dos ácidos cítrico e glucônico que estão envolvidos no processo de colonização do *P. expansum* nos frutos de maçã (Prusky e Lichter, 2008).

Finalmente, frutos não inoculados e armazenados nas embalagens de fundo duplo mantiveram sua firmeza ao longo do período experimental, ao passo que diferenças estatísticas significativas foram observadas na firmeza dos frutos de maçã armazenados com β -CD, ICp e ICsa durante o período experimental (Tabela 4.2). A firmeza de polpa dos frutos armazenados com β -CD foi similar à observada quando os frutos foram apenas inoculados com o fitopatógeno, variando de 5,4 kg/cm² (dia 0) para 0 kg/cm² (dia 12), diferindo dos ICp e ICsa, que variaram entre 5,4 kg/cm² no início do experimento para 2,0 ou 2,3 kg/cm² ao final do experimento, respectivamente (Tabela 4.2).

Tais diferenças podem ser explicadas à luz dos resultados relativos a VCL, e ao diâmetro final de lesão (Figura 4.3A e B), envolvendo a colonização do fitopatógeno e a degradação tecidual dos frutos a partir da ativação de genes destes responsáveis pela secreção de diferentes ácidos e enzimas (Barad et al., 2013).

Tabela 4.2. Parâmetros físico-químicos dos frutos de maçã armazenados por até 12 dias em embalagens de fundo duplo feitas de polietileno tereftalato (PET), e contendo β -ciclodextrinas (β -CD), ou complexos de inclusão (ICs) de palmarosa (ICp) ou anis estrelado (ICsa).

Tratamentos	PM (%)			
	Dia 0	Dia 4	Dia 8	Dia 12
Frutos não inoculados	0 ± 0 A a	1,9 + 2,4 A b	4,4 + 1,9 A b	6,6 + 1,6 A c
Frutos inoculados	0 ± 0 A a	18,5 + 5,2 B b	21,8 + 1,9 C b	23,4 + 1,3 C b
β -CD	0 ± 0 A a	7,5 + 4,1 A b	19,5 + 4,8 C c	24,5 + 0,5 C c
ICp	0 ± 0 A a	2,3 + 2,3 A b	10,3 + 0,6 B c	17,5 + 2,1 B d
ICsa	0 ± 0 A a	5,5 + 3,4 A b	12,4 + 3,3 B c	14,9 + 3,6 B c
SST (°Brix)				
	Dia 0	Dia 4	Dia 8	Dia 12
Frutos não inoculados	12,8 + 0,2 A a	12,9 + 0,2 A a	13,1 + 0,1 A a	13,2 + 0,2 A a
Frutos inoculados	12,8 + 0,2 A a	14,0 + 0,3 C b	14,1 + 0,3 B b	14,3 + 0,2 B b
β -CD	12,8 + 0,2 A a	13,3 + 0,2 B b	13,8 + 0,1 B c	14,2 + 0,3 B c
ICp	12,8 + 0,2 A a	12,9 + 0,1 A a	13,0 + 0,2 A b	13,4 + 0,2 A b
ICsa	12,8 + 0,2 A a	12,3 + 0,5 A a	12,8 + 0,3 A a	13,0 + 0,2 A a
AT (mg ácido málico / 100mL de suco)				
	Dia 0	Dia 4	Dia 8	Dia 12
Frutos não inoculados	0,34 + 0,03 A a	0,32 + 0,02 AB a	0,30 + 0,02 A a	0,28 + 0,02 A a
Frutos inoculados	0,34 + 0,03 A a	0,44 + 0,03 C b	0,46 + 0,04 C b	0,48 + 0,04 C b
β -CD	0,34 + 0,03 A a	0,38 + 0,02 BC a	0,41 + 0,02 BC ab	0,44 + 0,02 B b
ICp	0,34 + 0,03 A a	0,36 + 0,02 B ab	0,38 + 0,01 B ab	0,40 + 0,02 AB b
ICsa	0,34 + 0,03 A a	0,30 + 0,03 A a	0,32 + 0,02 A a	0,34 + 0,05 A a
pH				
	Dia 0	Dia 4	Dia 8	Dia 12
Frutos não inoculados	3,85 + 0,07 A a	3,79 + 0,10 B a	3,81 + 0,09 C a	3,83 + 0,08 C a
Frutos inoculados	3,85 + 0,07 A c	3,52 + 0,08 A b	3,38 + 0,07 A b	3,23 + 0,08 A a
β -CD	3,85 + 0,07 A b	3,50 + 0,10 A a	3,40 + 0,12 A a	3,28 + 0,14 A a
ICp	3,85 + 0,07 A b	3,61 + 0,03 A a	3,60 + 0,02 B a	3,57 + 0,02 B a
ICsa	3,85 + 0,07 A a	3,82 + 0,05 B a	3,79 + 0,07 C a	3,73 + 0,05 C a
FF (kg/cm2)				
	Dia 0	Dia 4	Dia 8	Dia 12
Frutos não inoculados	5,4 + 0,2 A a	5,6 + 0,2 C a	5,5 + 0,1 C a	5,4 + 0,2 C a
Frutos inoculados	5,4 + 0,2 A d	3,1 + 0,1 A c	1,5 + 0,1 A b	0,0 + 0,0 A a
β -CD	5,4 + 0,2 A d	3,6 + 0,5 A c	1,8 + 0,2 A b	0,0 + 0,0 A a
ICp	5,4 + 0,2 A d	4,8 + 0,2 B c	3,4 + 0,4 B b	2,0 + 0,2 B a
ICsa	5,4 + 0,2 A c	5,5 + 0,1 C c	3,9 + 0,1 B b	2,3 + 0,1 B a

Legendas: PM – perda de massa; SST – sólidos solúveis totais; AT – acidez titulável; pH – potencial Hidrogeniônico; FF – firmeza do fruto.

4. Conclusão

Os complexos de inclusão formados entre as β -CD e os OEs de palmarosa e anis estrelado inibiram o crescimento e desenvolvimento de *P. expansum in vitro* nas primeiras 48h, liberando os OEs ao *headspace*. Após este período, um pequeno crescimento das colônias do fungo foi observado, no entanto, devido ao aumento das concentrações dos compostos ativos, o crescimento foi inibido e o fungo inativado. Adicionados às embalagens de fundo duplo, os ICs também afetaram o desenvolvimento do bolor azul em frutos de maçãs cv. Red Delicious, mantendo os níveis de etileno próximos àqueles observados em frutos não inoculados, e também mantendo algumas propriedades físico-químicas dos frutos, tais como, massa, SST, AT, pH e FF.

Neste sentido, conclui-se que as embalagens de fundo duplo feitas de PET associadas aos ICs de palmarosa e anis estrelado podem ser alternativas comerciais viáveis ao armazenamento de frutos de maçã no pós-colheita, propiciando um aumento no tempo de prateleira dos frutos e reduzindo a podridão pelo fungo. No entanto, uma análise sensorial faz-se necessária para detectar se os OEs modificam o sabor dos frutos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os óleos essenciais são uma boa alternativa para o controle de fungos causadores de podridões, como o fungo utilizado na presente tese: *P. expansum*. Por apresentarem diversos mecanismos de ação, tais como danos na membrana plasmática, danos na parede celular, geração de espécies reativas de oxigênio, dentre outros, os óleos essenciais dificilmente selecionarão isolados resistentes aos seus princípios ativos, apresentando ainda a vantagem de, em sua maioria, serem classificados como *GRAS* pelo FDA.

Ademais, por serem constituídos de moléculas facilmente oxidadas por fatores ambientais, bem como por apresentarem uma rápida dispersão no ambiente, sua aplicação direta *in situ* é inviável, tornando-se necessária a utilização de métodos complementares que mitiguem tais efeitos negativos. Nesse sentido, a utilização de β -ciclodextrinas como agentes encapsulantes demonstrou-se eficiente, possibilitando o emprego das moléculas presentes nos óleos essenciais de palmarosa e anis estrelado (modelos) *in situ*, a partir da sua utilização em embalagens bioativas, onde através da liberação das moléculas dos OEs a partir das β -CD, em um ambiente que as reteve (embalagens), inibiu o desenvolvimento do bolor azul em frutos de maçã, preservando suas propriedades físico-químicas.

Ademais, sugere-se a validação destas embalagens em outros patossistemas semelhantes, valendo-se de outros OEs, de outros métodos de encapsulamento, e de outras condições ambientais, assim como a utilização dos presentes ICs em outros sistemas de embalagens bioativas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abarca, R. L., Rodriguez, F. J., Guarda, A., Galotto, M. J., Bruna, J. E. 2015. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. **Food Chemistry**, v. 196, p. 968-975.

Abundant Health Llc. **AHLLC**. Disponível em: <www.abundanthealth4u.com/glass_plastic_s/3.htm>. Acesso em: 27 de Abril de 2017.

Agricultural Marketing Resource Center. **USDA**. Disponível em: <http://www.agmrc.org/commodities_products/fruits/>. Acesso em: 16 de Janeiro de 2018.

Almenar, E., Auras, R., Wharton, P., Rubino, M., Harte, B. 2007a. Release of acetaldehyde from β -cyclodextrins inhibits postharvest decay fungi *in vitro*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7205-7212.

Almenar, E., Auras, R., Rubino, M., Harte, B. 2007b. A new technique to prevent the main post harvest diseases in berries during storage: inclusion complexes β -cyclodextrin-hexanal. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, p. 164-172.

Almenar, E., Auras, R., Harte, B., Rubino, M. 2007. **Micro-encapsulation of volatile compounds into cyclodextrins: A new technology to reduce post harvest losses**. US Patent. 0207981, 12p.

Almenar, E., Catala, R., Hernandez-Muños, P., Gavara, R. 2009. Optimization of an active package for wild strawberries based on the release of 2-nonanone. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 587-593.

Almenar, E., Samsudin, H., Auras, R., Harte, J. 2010. Consumer acceptance of fresh blueberries in bio-based packages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 1121-1128.

Almenar, E., Auras, R., Harte, B., Rubino, M. 2009. **Beta-cyclodextrins as nucleating agents for poly(lactic acid)**. US Patent. 0060860, 10 p.

Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, J.D., Arlorio, M., Dessi, S., Coroneo, V., Cabras, P. 2004. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L.. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3530-3535.

ASTM International. **Standard practice for heat flow calibration of differential scanning calorimeters**. In: E968-02, American National Standard Institute. 2002.

ASTM International. **Standard practice for temperature calibration of differential scanning calorimeters and differential thermal analyzers**. In: E967-03, American National Standard Institute. 2003a.

ASTM International. **Standard test for transition temperatures and enthalpies of fusion and crystallization of polymers by differential scanning calorimetry**. In: D3418-03, American National Standard Institute. 2003b.

Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R., Simal-Gandara, J. 2009. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1631-1640.

Ayala-Zavala, J. F., Soto-Valdez, H., González-León, A., Álvarez-Parrilla, E., Martín-Belloso, O., González-Aguilar, G. A. (2008). Microencapsulation of cinnamon leaf (*Cinnamomum zeylanicum*) and garlic (*Allium sativum*) oils in β -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macroscopic Chemistry**, v. 60, p. 359–368.

Baert, K., Devlieghere, F., Flyps, H., Oosterlinck, M., Ahmed, M.M., Rajković, A., Verlinden, B., Nicolai, B., Debevere, J., De Meulenaer, B. 2007. Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, 170-81.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p. 446-475.

Banco Regional de Desenvolvimento do Extremo Sul. **BRDE**. Cadeia produtiva da maçã no Brasil: limitações e potencialidades. Porto Alegre: 2011. 44 p.

Barad, S., Horowitz, S. B., Kobiler, I., Sherman, A., Prusky, D., Barad, Shiri., Howowitz, Sigal Brown., Kobiler, Illana., Sherman, Amir., Prusky, D. 2013. Accumulation of the Mycotoxin Patulin in the Presence of Gluconic Acid Contributes to Pathogenicity of *Penicillium expansum*. **Molecular Plant-Microbs Interactions**, v. 27, p. 66-77.

Baranska, M., Schulz, H., Reitzenstein, S., Uhlemann, U., Strehle, M. A., Krüger, H., Popp, J. 2005. Vibrational spectroscopic studies to acquire a quality control method of eucalyptus essential oils. **Biopolymers**, v. 78, p. 237-248.

Bekele, E.A., Ampofo-Asiama, J., Alis, R.R., Hertog, M.L.A.T.M., Nicolai, B.M., Geeraerd, A.H. 2016. Dynamics of metabolic adaptation during initiation of controlled atmosphere storage of “Jonagold” apple: Effects of storage gas concentrations and conditioning. **Postharvest Biology and Technology**, v. 117, 9-20.

Bhandari, B. R., Arcy, B. R. D., Le, L., Bich, T. 1998. Lemon oil to β -cyclodextrin ratio effect on the inclusion efficiency of β -cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1494-1499.

Bleicher, J. História da Macieira. In: EPAGRI. **A Cultura da Macieira**. Florianópolis, 2002. 743p.

Borecka, H.W., 1976. Effect of BCM fungicides on the incidence of fungi rots of apple, strawberry, and raspberry fruit, and degradation of BCM residues in fruits in CA storage. **Research Institute of Pomology and Floriculture**, Poland PL-ARS29, FG-PO-308.

Bouchra, C., Achouri, M., Idrissi Hassani, L.M., Hmamouchi, M., 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatea against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. J. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 165-169.

Buron-Moles, G., Lopez-Perez, M., Gonzalez-Candelas, L., Viãs, I., Teixido, N., Usual, J., Torres, R. 2012. Use of GFP-tagged strains of

Penicillium digitatum and *Penicillium expansum* to study host-pathogen interactions in oranges and apples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, p. 162-170.

Burt, S. 2004. Essential oils: their application properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-53

Cabral, L.C., Pinto, V.F., Patriarca, A. 2013. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, p. 1-14.

Camele, I., Altieri, L., de Martino, L., de Feo, V., Mancini, E., Rana, G.L. 2012. *In vitro* control of post-harvest fruit rot fungi by some plant essential oil components. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 2290-2300.

Camilo, A.P., Denardi, F. Cultivares: descrição e comportamento no sul do Brasil. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis, 2002. 743p.

Cerioni, L., Volentini, S.I., Prado, F.E., Rapisarda, V.A., Rodriguez-Montelongo, L., 2010. Cellular damage induced by a sequential oxidative treatment on *Penicillium digitatum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1441–1449.

Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A.B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata*, (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): A short review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 501-506.

Chen, G., Liu, B. 2016. Cellulose sulfate based film with slow-release antimicrobial properties prepared by incorporation of mustard essential oil and β -cyclodextrin. **Food Hydrocolloids**, v. 55, p. 100-107.

Chu, C.L., Liu, W.T., Zhou, T. 2001. Fumigation of sweet cherries with thymol and acetic acid to reduce post harvest brown rot and blue mold rot. **Fruits**, v. 56, p. 123-130.

- Conway, W. S., Janisiewicz, W. J., Leverentz, B., Saftner, R. A., Camp, M. J. 2007. Control of blue mold of apple by combining controlled atmosphere, an antagonist mixture, and sodium bicarbonate. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, p. 326-332.
- de Corato, U., Maccioni, O., Trupo, M., di Sanzo, G. 2010. Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against post harvest spoilage fungi. **Crop Protection**, v. 29, p. 142-147.
- Costa, P., Medronho, B., Gonçalves, S., Romano, A. 2015. Cyclodextrins enhance the antioxidant activity of essential oils from three lamiaceae species. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 341-346.
- Crini, G. 2014. Review: A history of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 10940-10975.
- Daferera, D. J., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. G. 2002. Characterization of essential oils from Lamiaceae species by Fourier transform Raman spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5503-5507.
- Del Valle, E. M. M. 2004. Cyclodextrins and their uses: A review. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1033-1046.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., Wilson, C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? **Postharvest Biology and Technology**, v. 52, p. 137-145.
- Dubey, V. S., Luthra, R. 2001. Biotransformation of geranyl acetate to geraniol during palmarosa (*Cymbopogon martinii*, Roxb. wats. var. motia) inflorescence development. **Phytochemistry**, v. 57, p. 675-680.
- Egyed, O. 1990. Spectroscopic studies on β -cyclodextrin. **Vibrational Spectroscopy**, v. 240, p. 225-227.
- Eliasson, A.C. **Carbohydrates in food**. British: TAYLOR AND FRANCIS GROUP, 2006. 560p.

de Ell, J. R., Lum, G. B., Ehsani-Moghaddam, B. 2016. Elevated carbon dioxide in storage rooms prior to establishment of controlled atmosphere affects apple fruit quality. **Postharvest Biology and Technology**, v. 118, p. 11-16.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **EMBRAPA**. Colheita e Pós-colheita. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/pera/arvore/CONT000gjr2dp4r02wx5ok06wjwxcx17p1ha2.html>>. Acesso em: 16 de Janeiro de 2018.

Fallik, E. Postharvest treatments affecting sensory quality of fresh and fresh-cut products. In: **Postharvest Biology and Technology of Fruits, Vegetables, and Flowers**. United States of America: WILEY-BLACKWELL, 2008. 497 p.

Fathi, M., Martin, A., McClements, D. 2014. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 39, p. 18-39.

Fenyvesi, É., Vikmon, M.A, Szente, L. 2015. Cyclodextrins in food technology and human nutrition: benefits and limitations in 2012. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 8398, p. 37-41.

Filonow, A.B. 2005. Wound type in apple fruits affects wound resistance to decay-causing fungi. **Journal of Plant Pathology**. v. 87, p. 233-238.

Frankova, A., Smid, J., Bernardos, A., Finkousova, A., Marsik, P., Novotny, D., Legarova, V., Pulkrabek, J., Kloucek, P. 2016. The antifungal activity of essential oils in combination with warm airflow against postharvest phytopathogenic fungi in apples. **Food Control**, v. 68, p. 62-68.

Frisvad, J.C., Samson, R.A. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-born tervertiillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 1-174

Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Faostat**. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org/default.aspx>>. Acesso em: 17 de Setembro de 2017.

Galvão, J. G., Silva, V. F., Ferreira, S. G., França, F. R. M., Santos, D. A., Freitas, L. S., Nunes, R. S. 2015. β -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae. **Thermochimica Acta**, v. 608, p. 14-19.

Gazim, Z.C., Rezende, C.M., Fraga, S.R., Dias Filho, B.P., Nakamura, C.V., Cortez, D.A.G. 2008. Analysis of the essential oils from *Calendula officinalis* growing in Brazil using three different extraction procedures. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 44, p. 391-395.

Gong, L., Li, T., Chen, F., Duan, X., Yuan, Y., Zhang, D., Jiang, Y. 2016. An inclusion complex of eugenol into β -cyclodextrin: Preparation, and physicochemical and antifungal characterization. **Food Chemistry**, v. 196, p. 324-330.

Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., Nerín, C. 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, v. 116, p. 982-989.

Gudi, G., Krahmer, A., Kruger, H., Hennig, L., Schulz, H. 2014. Discrimination of fennel chemotypes applying IR and raman spectroscopy: Discovery of a new γ -asarone chemotype. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 3537-3547.

Guerreiro, A.C., Gago, C.M.L., Faleiro, M.L., Miguel, M.G.C., Antunes, M.D.C., 2015. The use of polysaccharide-based edible coatings enriched with essential oils to improve shelf-life of strawberries. **Postharvest Biology and Technology**, v. 110, p. 51-60.

Gunderson, M. A., Wysocki, A. F., Sterns, J. A. A functional evaluation of business models in fresh produce in the United States. In: **Postharvest Handling: A Systems Approach**. British: ELSEVIER, 2009. 594 p.

Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., van Otterdijk, R., Meybeck, A. Global food losses and food waste. Rome: Food And Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/ags/publications/GFL_web.pdf>. Acesso em: 16 de Janeiro de 2018.

Hac-Wydro, K., Flasiński, M., Romanczuk, K., 2017. Essential oils as food eco-preservatives: Model system studies on the effect of temperature on limonene antibacterial activity. **Food Chemistry**, v. 235, p. 127-135.

Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. 2004. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 1081-1085.

Hernández-Sánchez, P., López-Miranda, S., Guardiola, L., Serrano-Martínez, A., Gabaldón, J.A., Nuñez-Delgado, E. 2016. Optimization of a method for preparing solid complexes of essential clove oil with β -cyclodextrins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 420-426.

Hill, L., Gomes, C., Taylor, T. 2013. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (*trans*-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. **LWT – Food Science and Technology**, v. 51, p. 86-93.

Hu, Y., Zhang, J., Kong, W., Zhao, G., Yang, M. 2017. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. **Food Chemistry**, v. 220, p. 1–8.

Huang, C.C. 2016. Applications of Raman spectroscopy in herbal medicine. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 51, p. 1-11.

Huang, Y., Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Gong, Y., Chen, X., Jiang, W. 2010. Antifungal activity of the essential oil of illicium verum fruit and its main component *trans*-anethole. **Molecules**, v. 15, p. 7558-7569.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **IBGE**. Banco de dados agregados. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>>. Acesso em: 18 de Janeiro de 2017.

Janisiewicz, W.L., Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 411-441.

Jayasena, D.D., Jo, C., 2013. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 34, p. 96-108.

Johnston, J. W., Hewett, E. W., Hertog, M. L. A. T. M. 2002. Postharvest softening of apple (*Malus domestica*) fruit: A review. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 30, p. 145-160.

Joo, M., Auras, R., Almenar, E. 2011. Preparation and characterization of blends made of poly(l-lactic acid) and β -cyclodextrin: improvement of the blend properties by using a master batch. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1022-1030.

Joo, M., Merkel, C., Auras, R., Almenar, E. 2012. Development and characterization of antimicrobial poly(l-lactic acid) containing trans-2-hexenal trapped in cyclodextrins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 297-305.

Joyce, B. L., Zheljzkov, V. D., Sykes, R., Cantrell, C. L., Hamilton, C., Mann, D. G. J., Neal Stewart, C. 2015. Ethanol and high-value terpene co-production from Lignocellulosic biomass of *Cymbopogon flexuosus* and *Cymbopogon martinii*. **PLoS ONE**, v. 10, p. 1-17.

Kader, A.A. **Postharvest Technology of Horticultural Crops**. California: PUBL, 1992. 296 p.

Kayaci, F., Sen, H. S., Durgun, E., Uyar, T. 2014. Functional electrospun polymeric nanofibers incorporating geraniol-cyclodextrin inclusion complexes: High thermal stability and enhanced durability of geraniol. **Food Research International**, v. 62, 424-431.

Kfoury, M., Auezova, L., Greige-Gerges, H., Ruellan, S., Fourmentin, S. 2014. Cyclodextrin, an efficient tool for *trans*-anethole encapsulation: Chromatographic, spectroscopic, thermal and structural studies. **Food Chemistry**, v. 164, p. 454-461.

Kfoury, M., Auezova, L., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S. 2015. Promising applications of cyclodextrins in food: improvement of essential oils retention, controlled release and antiradical activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 264-272.

Kimati, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A., Rezende, J.A.M. **Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas**. São Paulo: CERES, 1997. 706 p.

Kohata, S., Jyodoi, K., Ohyoshu, A. 1993. Thermal decomposition of cyclodextrins (alpha, beta, gamma, and modified beta-CyD) and of metal-(B-CyD) complexes in the solid phase. **Thermochemica Acta**, v. 217, p. 187-198.

Koutsimanis, G., Harte, J., Almenar, E. 2014. Freshness maintenance of cherries ready for consumption using convenient, microperforated, bio-based packaging. **Journal of the Science of Food and Agriculture**.

Kozlovskii, A.G., Zhelifonova, V.P., Antipova, T.V. 2013. Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, p. 5-16.

Kubeczka, K.H. Possibilities and limitations of quality assessment of the use of the essential oils. In: **Essential oils – claim and reality**. Germany: SCIENTIFIC PUBLISHING COMPANY. p. 85-102. 1993.

Labuza, T.P. Sorption phenomena in foods: Theoretical and practical aspects. In: **Theory, determination and control of physical properties of food materials**. Dordrecht, Netherlands, 1975. Capítulo 10, p. 197-219.

Lee, H.S., Lee, S.W., Cho, K.Y, Kim, M.K., Ahn, Y.J. 2001. Fungicidal activities of 51 fruit extracts against six phytopathogenic fungi. **Agricultural Chemistry and Biotechnology**, v. 44, p. 147-153.

- Li, J., Lei, H., Song, H., Lai, T., Xu, X., Shi, X., 2017. 1-methylcyclopropene (1-MCP) suppressed postharvest blue mold of apple fruit by inhibiting the growth of *Penicillium expansum*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 125, p. 59-64.
- Lim, G.O., Hong, Y.H., Song, K.B. 2010. Application of *Gelidium corneum* edible films containing carvacrol for ham packages. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 90-93.
- Liu, W.T., Chu, C.L., Zhou, T. 2002. Thymol and acetic acid vapors reduced postharvest brown rot on apricots and plums. **HortScience**, v. 37, p. 151-156.
- Lucera, A., Costa, C., Conte, A., del Nobile, M.A. 2012. Food applications of natural antimicrobial compounds. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-13.
- Luchi, V. L. Botânica e fisiologia. In: EPAGRI. **A Cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002. 743p.
- Mahlo, S.M., McGaw, L.J., Eloff, J.N. 2010. Antifungal activity of leaf extracts from South African trees against plant pathogens. **Crop Protection**, v. 29, p. 1529-1533.
- Malhotra, B., Keshwani, A., Kharkwal, H., 2015. Antimicrobial food packaging: Potential and pitfalls. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-9.
- Marandi, R.J., Hassani, A., Ghosta, Y., Abdollahi, A., Pirzad, A., Sefidkon, F. 2011. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on pear with *Thymus kotschyanus*, *Ocimum basilicum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 626-634.
- Marcolino, V. A., Zanin, G. M., Durrant, L. R., Benassi, M. D. T., Matioli, G. 2011. Interaction of curcumin and bixin with β -cyclodextrin: Complexation methods, stability, and applications in food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 3348-3357.

Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.I., Lee, Y.C., 2005. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, v. 339, p. 69-72.

Maxin, P., Weber, R.W.S., Pedersen, H.L., Williams, M. 2012. Control of a wide range of storage rots in naturally infected apples by hot-water dipping and rising. **Postharvest Biology and Technology**, v. 70, p. 25-31.

McClements, D.V. Structural design principles for improved food performance: Nanolaminated biopolymer structures in foods. In: **Micro/Nanoencapsulation of Active Food Ingredients**. American Chemical Society, 2009. 314 p.

Menezes, P. P., Serafini, M. R., Santana, B. V., Nunes, R. S., Quintans, L. J., Silva, G. F., Medeiros, I. A., Marchioro, M., Fraga, B. P., Santos, M. R. V., Araújo, A. A. S. 2012. Solid-state β -cyclodextrin complexes containing geraniol. **Thermochimica Acta**, v. 548, p. 45-50.

Menezes, P. P., Serafini, M. R., Quintans-Júnior, L. J., Silva, G. F., Oliveira, J. F., Carvalho, F. M. S., Souza, J. C. C., Matos, J. R., Alves, P. B., Matos, I. L., Hadaruga, D. I., Araújo, A.A.S. 2014. Inclusion complex of (-)-linalool and β -cyclodextrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, p. 2429-2437.

Merkel, C., Joo, M., Rai, D., Ryser, E., Almenar, E. 2011. The kinetics of trans-2-hexenal release from an antimicrobial bio-based polymer matrix made of poly(L-lactic acid). **Proceedings of the 25th IAPRI Symposium on Packaging (IAPRI 2011)**. Berlin, Alemanha.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **MAPA**. Cenário da cadeia produtiva da maçã. Informativo N° 5. v. 54, p. 1 – 7, 2013.

Mohan, P. R. K., Sreelakshmi, G., Muraleedharan, C. V., Joseph, R. 2012. Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: Characterization by FT-Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 62, p. 77-84.

Mondino, P., di Masi, S., Falconi, C., Montealegre, J., Henrique, J.L., Nunes, C., Salazar, M., Stadnik, M.J., Vero, S., Usall, J. **Manual de**

identificação de doenças da maçã em pós-colheita. Montevideo: CYTED, 2009. 67 p.

Morales, H., Marín, S., Ramos, A. J., Sanchis, V. 2010. Influence of post-harvest technologies applied during cold storage of apples in *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation: A review. **Food Control**, v. 21, p. 953-962.

Moscetti, R., Carletti, L., Monarca, D., Cecchini, M., Stella, E., Massantini, R. 2013. Effect of alternative postharvest control treatments on the storability of “Golden Delicious” apples. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 2691-2697.

National Center for Biotechnology Information. **Pubchem Substance Database.** Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 16 de Maio de 2017.

Nguefack, J., Dongmo, J.B.L., Dakole, C.D., Leth, V., Vismer, H.F., Torp, J., Guemdjom, E.F.N., Mbeffo, M., Tamgue, O., Fotio, D., Zollo, P.H.A., Nkengfack, A.E., 2009. Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 151-156.

Nguefack, J., Tamgue, O., Lekagne Dongmo, J.B., Dakole, C.D., Leth, V., Vismer, H.F., Amvam Zollo, P.H., Nkengfack, A.E. 2012. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **Food Control**, v. 23, p. 377-383.

Nieddu, M., Rassu, G., Boatto, G., Bosi, P., Trevisi, P., Giunchedi, P., Carta, A., Gavini, E. 2014. Improvement of thymol properties by complexation with cyclodextrins: *In vitro* and *in vivo* studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 393-399.

Og, L.S., Park, I.K., Choi, G.J., Lim, H.K., Jang, K.S., Cho, K.Y., Shin, S.C., Kim, J.C. 2007. Fumigant activity of essential oils and components of *Illicium verum* and *Schizonepeta tenuifolia* against *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 1568-1572.

Organização Mundial da Saúde. **OMS**. Disponível em: <<http://www.who.int/publications/en/>>. Acesso em: 17 de Setembro de 2017.

Osório, G.T., Oliveira, B.S., Di Piero, R.M. 2013. Efeito de agentes fumigantes sobre o bolor azul e mofo cinzento em frutos de maçã. **Tropical Plant Pathology**. v. 38, p. 63-67.

Padmashree, A., Roopa, N., Semwal, A. D., Sharma, G. K., Agathian, G., Bawa, A. S. 2007. Star-anise (*Illicium verum*) and black caraway (*Carum nigrum*) as natural antioxidants. **Food Chemistry**, v. 104, p. 59-66.

Perdones, A., Escriche, I., Chiralt, A., Vargas, M. 2016. Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on volatile profile of strawberries during storage. **Food Chemistry**, v. 197, p. 979-986.

Pérez-Alfonso, C.O., Martínez-Romero, D., Zapata, P.J., Serrano, M., Valero, D., Castillo, S., 2012. The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* involved in lemon decay. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, p. 101-106.

Petri, J.L., Palladini, L.A., Pola, A.C. Dormência e indução de brotação da macieira. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002. 743p.

Petri, J.L., Leite, G.B., Cesa, J.D. Padronização e classificação da maçã. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002. 743p.

Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G., Henriques, M. 2014. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 121-135.

Pitt, J. I., Hocking, A. D. **Fungi and food spoilage**. Netherlands: SPRINGER, 2013. 542 p.

Ponce Cevallos, P. A., Buera, M. P., Elizalde, B. E. 2010. Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and

thymol) in Beta-cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. **Journal of Food Engineering**, v. 99, p. 70-75.

Poulsen, M.E., Naef, A., Gasser, S., Christen, D., Rasmussen, P.H. 2009. Influences of different disease control pesticide strategies on multiple pesticide residue levels in apple. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 84, p. 58-61.

Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P.K., Dubey, N.K., 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges. **Food Control**, v. 47, p. 381-391.

Prashar, A., Hili, P., Veness, R.G., Evans, C.S. 2003. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 569-575.

Prusky, D., Lichter, A. 2008. Mechanisms modulating fungal attack in postharvest pathogen interactions and their control. **European Journal of Plant Pathology**, v. 121, p. 281-289.

Quaglia, M., Ederli, L., Pasqualini, S., Zizzerini, A., 2011. Biological control agents and chemical inducers of resistance for postharvest control of *Penicillium expansum* Link. on apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 59, p. 307-315.

Rakmai, J., Cheirsilp, B., Mejuto, J. C., Torrado-Agrasar, A., Simal-Gandara, J. 2017. Physico-chemical characterization and evaluation of bio-efficacies of black pepper essential oil encapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Food Hydrocolloids**, v. 65, p. 157-164.

Ramos, M., Jimenez, A., Peltzer, M., Garrigos, M. C. 2014. Development of novel nano-biocomposite antioxidant films based on poly (lactic acid) and thymol for active packaging. **Food Chemistry**, v. 162, p. 149-155.

Ran, C., Chen, D., Xu, M., Du, C., Li, Q., & Jiang, Y. 2016. A study on characteristic of different sample pretreatment methods to evaluate the entrapment efficiency of liposomes. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.

1028, 56–62.

Rao, B. R. R., Kaul, P. N., Syamasundar, K. V., Ramesh, S. 2005. Chemical profiles of primary and secondary essential oils of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats var. *motia* Burk.). **Industrial Crops and Products**, v. 21, p. 121-127.

Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., Martin-Belloso, O. 2008. Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 313-327.

Reineccius, T. A., Reineccius, G. A., Peppard, T. L. 2005. The effect of solvent interactions on α -, β -, and γ -cyclodextrin/flavor molecular inclusion complexes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 388-392.

Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., Melo, N.R. de, Sanches-Silva, A., 2017. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. **Trends in Food Science and Technology**, v. 61, p. 132-140.

Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T., Symons, M.C.R. **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology**. Amsterdam: ELSEVIER, 1991. 534p.

da Rocha, M.E.B., Freire, F.C.O., Maia, F.E.F., Guedes, M.I.F., Rondina, D. 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, p. 159-165.

da Rocha Neto, A.C., de Oliveira da Rocha, A.B., Maraschin, M., Di Piero, R.M., Almenar, E., 2017. Factors affecting the entrapment efficiency of β -cyclodextrins and their effects on the formation of inclusion complexes containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 77C, p. 510-524.

da Rocha Neto, A.C., Maraschin, M., Di Piero, R.M., 2015. Antifungal activity of salicylic acid against *Penicillium expansum* and its possible mechanisms of action. **International Journal of Food Microbiology**, v. 215, p. 64-70.

- da Rocha Neto, A. C., Luiz, C., Maraschin, M., Di Piero, R. M. 2016. Efficacy of salicylic acid to reduce *Penicillium expansum* inoculum and preserve apple fruits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 221, p. 54-60.
- Rojas-Grau, M.A., Raybaudi-Massilia, R.M., Solive-Fortuny, R.C., Avena-Bustillos, R.J., McHugh, T.H., Martini-Belloso, O. 2007. Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf life of fresh-cut apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, p. 254-264.
- Rusa, C. C., Bullions, T. A., Fox, J., Porbeni, F. E., Wang, X., Tonelli, A. E. 2002. Inclusion compound formation with a new columnar cyclodextrin host. **Langmuir**, v. 18, p. 10016–10023.
- Sadaka, F., Nguimjeu, C., Brachais, C.H., Vroman, I., Tighzert, L., Couvercelle, J.P. 2014. Review of antimicrobial packaging containing essential oils and their active biomolecules. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. p. 1-23.
- Saidana, D., Mahjoub, M.A., Boussaada, O., Chriaa, J., Cheraif, I., Daami, M., Mighri, Z., Helal, A.N. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile compounds of *Tamarix boveana* (Tamaricaceae). **Microbiological Research**, v. 163, p. 445-455.
- Sajilata, M.G., Savitha, K., Singhal, R.S., Kanetkar, V.R., 2007. Scalping of flavors in packaged foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 6, p. 17-35.
- Samperio, C., Boyer, R., Eigel, W.N., Holland, K.W., McKinney, J.S., O’Keefe, S.F., Smith, R., Marcy, J.E., 2010. Enhancement of plant essential oils’ aqueous solubility and stability using alpha and beta cyclodextrin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 12950–12956.
- Sams, C.E., Conway, W.S. 1987. Additive effects of controlled-atmosphere storage and calcium chloride on decay, firmness retention, and ethylene production in apples. **Plant Disease**, v. 71, p. 1003-1005.

Sanzani, S.M., Girolamo, A., Schena, L., Solfrizzo, M., Ippolito, A., Visconti, A., 2009. Control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on apples by quercetin and umbelliferone. **European Food Research and Technology**, v. 228, p. 381-389.

Sanzani, S.M., Schena, L., Girolamo, A., Ippolito, A., Gonzalez-Candela, L. 2010. Characterization of genes associated with induced resistance against *Penicillium expansum* in apple fruit treated with quercetin. **Postharvest Biology and Technology**, v. 56, p. 1-11.

Schulz, H., Baranska, M. 2007. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 43, p. 13-25.

Schulz, H., Schrader, B., Quilitzsch, R., Pfeffer, S., Krüger, H. 2003. Rapid classification of basil chemotypes by various vibrational spectroscopy methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2475-2481.

Sela, S., Fallik, E. Microbial Quality and Safety of Fresh Produce. In: **Postharvest Handling: A Systems Approach**. British: ELSEVIER, 2009. 594 p.

Sellamuthu, P.S., Mafune, M., Sivakumar, D., Soundy, P. 2013. Thyme oil vapour and modified atmosphere packaging reduce anthracnose incidence and maintain fruit quality in avocado. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 3024-3031.

Shao, X., Wang, H., Xu, F., Cheng, S. 2013. Effects and possible mechanisms of tea tree oil vapor treatment on the main disease in postharvest strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 77, p. 94-101.

Singh, G., Marimuthu, P. 2006. Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (Seed) essential oil, oleoresin, and their selected compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 174-181.

Singh, G., Maurya, S., DeLampasona, M.P., Catalan, C., 2006. Chemical constituents, antimicrobial investigations and antioxidative

potential of volatile oil and acetone extract of star anise fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 111–121.

Sinha, L., Prasad, O., Chand, S., Sachan, A. K., Pathak, S. K., Shukla, V. K., Asiri, A. M. 2014. FT-IR, FT-Raman and UV spectroscopic investigation, electronic properties, electric moments, and NBO analysis of anethole using quantum chemical calculations. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v, 133, p 165–177.

Sinha, S., Biswas, D., Mukherjee, A. 2011. Antigenotoxic and antioxidant activities of palmarosa and citronella essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1521-1527.

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**, v. 64, p. 27–37.

Skandamis, P., Tsigarida, E., Nychas, G.J.E. 2002. The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5°C under aerobic, VP/MAP conditions. **Food Microbiology**, v. 19, p. 97-103.

Song, X., Zhao, Y., Hou, S., Xu, F., Zhao, R., He, J., Cai, Z., Li, Y., Chen, Q. 2008. Dual agents loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 445-453.

Sonvico, F., Cagnani, A., Rossi, A., Motta, S., Di Bari, M.T., Cavatorta, F., Alonso, M.J., Deriu, A., Colombo, P. 2006. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324, p. 67-73.

Strehle, K. R., Rösch, P., Berg, D., Schulz, H., Popp, J. 2006. Quality Control of Commercially Available Essential Oils by Means of Raman Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7020-7026.

Stojkovic, D., Sokovic, M., Glamoclija, J., Dzamic, A., Ciric, A., Ristic, M., Grubisic, D. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity

of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils. **Food Chemistry**, v. 128, p. 1017-1022.

Suhr, I.K., Nielsen, V.P. 2003. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 665-674.

Sung, Y. Y., Kim, Y. S., Kim, H. K. 2012. Illicium verum extract inhibits TNF- α - and IFN- γ -induced expression of chemokines and cytokines in human keratinocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, p. 182-189.

Tao, N., Jia, L., Zhou, H., 2014. Anti-fungal activity of Citrus reticulata Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**, v. 153, p. 265–71.

Troller, J. A. **Water Activity and Food**. United States of America: ACADEMIC PRESS, INC, 1978. 213 p.

Trovato, G.M. 2012. Behavior, nutrition and lifestyle in a comprehensive health and disease paradigm: skills and knowledge for a predictive, preventive and personalized medicine. **The EPMA Journal**, v. 3, p. 1-15.

Tserennadmid, R., Tako, M., Galgoczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vagvolgyi, C., Almassy, K., Krisch, J. 2011. Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 480-486.

Tohidi, B., Rahimmalek, M., Arzani, A. 2017. Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of Thymus species collected from different regions of Iran. **Food Chemistry**, v. 220, p. 153-161.

Tuan, D. Q., Ilgantileket, S. G. 1997. Liquid CO₂ extraction of essential oil from Star anise fruits (*Illicium verum* H.). **Journal of Food Engineering**, v. 31, p. 47-57.

Turek, C., Stintzing, F.C. 2013. Stability of essential oils: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, p. 40-53.

Uyar, T., Hunt, M. A., Gracz, H. S., Tonelli, A. E. 2006. Crystalline cyclodextrin inclusion compounds formed with aromatic guests: Guest-dependent stoichiometries and hydration-sensitive crystal structures. **Crystal Growth and Design**, v. 6, p. 1113-1119.

Veiga, F., Teixeira-Dias, J. J. C., Kedzierewicz, F., Sousa, A., Maincent, P. 1996. Inclusion complexation of tolbutamide with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 129, p. 63-71.

Veleirinho, B., Rei, M.F., da Silva, J.A.L. 2008. Solvent and concentration effects on the properties of electrospun poly(ethylene terephthalate) nanofiber mats. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**. v. 46, p. 460-471.

Veleirinho, B., Ribeiro-do-Valle, R.M., Lopes-daSilva, J.A. 2011. Processing conditions and characterization of novel electrospun poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)/chitosan blend fibers. **Materials Letters**. v. 65, p. 2216-2219.

Veleirinho, B., Berti, F.V., Dias, P.F., Maraschin, M., Ribeiro-do-Valler, R.M., Lopes-da-Silva, J.A. 2013. Manipulation of chemical composition and architecture of non-biodegradable poly(ethylene terephthalate)/chitosan fibrous scaffolds and their effects on L929 cell behavior. **Materials Science and Engineering: C**. v. 33, p. 37-46.

Vilanova, L., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Buron-Moles, G., Teixido, N. 2014a. Increasing maturity reduces wound response and lignification processes against *Penicillium expansum* (pathogen) and *Penicillium digitatum* (non-host pathogen) infection in apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 88, p. 54-60.

Vilanova, L., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Buron-Moles, G., Teixido, N. 2014b. Acidification of apple and orange hosts by *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum*. **International Journal of Food Microbiology**, v.178, p. 39-49.

Wan, L., Li, H., Huang, C., Feng, Y., Chu, G., Zheng, Y., Tan, W., Qin, Y., Sun, D., Fang, Y. 2017. Influence of the temperature on the (liquid + liquid) phase equilibria of (water + 1-propanol + linalool or geraniol). **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 109, p. 109-116.

Wang, J., Cao, Y., Sun, B., Wang, C. 2011. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1680-1685.

Wang, G., Hu, W., Huang, B., Qin, L., 2011. *Illicium verum* : A review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 10-20.

Wang, X., Luo, Z., Xiao, Z. 2014. Preparation, characterization, and thermal stability of β -cyclodextrin/soybean lecithin inclusion complex. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1027-1032.

Weber, R.W.S., Palm, G. 2010. Resistance of storage rot fungi *Neofabrae perennans*, *N. alba*, *Glomerella acutata* and *Neonectria galligena* against thiophanate-methyl in Northern German apple production. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 117, p. 185-191.

Wen, P., Zhu, D.-H., Wu, H., Zong, M.-H., Jing, Y.-R., Han, S.-Y., 2016. Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging. **Food Control**, v. 59, p. 366-376.

Wilson, C. L., Solar, J. M., Ghaouth, A. El, Scientist, V. 1997. Rapid Evaluation of Plant Extracts and Essential Oils for Antifungal Activity Against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v. 81, p. 204-210.

Yang, L. J., Xia, S., Ma, S. X., Zhou, S. Y., Zhao, X. Q., Wang, S. H., Yang, X. D. 2016. Host-guest system of hesperetin and β -cyclodextrin or its derivatives: Preparation, characterization, inclusion mode, solubilization and stability. **Materials Science and Engineering C**, v. 59, p. 1016-1024.

Zabka, M., Pavela, R., Slezakova, L. 2009. Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 250-253.

Zhang, L., Kosaraju, S. L. 2007. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. **European Polymer Journal**, v. 43, p. 2956-2966.

Zhang, C., Wang, J., Zhang, J., Hou, C., Wang, G. 2011. Effects of β -aminobutyric acid on control of postharvest blue mold of apple fruit and its possible mechanisms of action. **Postharvest Biology and Technology**, v. 61, p. 145-151.

Zhang, W., Li, X., Yu, T., Yuan, L., Rao, G., Li, D., Mu, C. 2015. Preparation, physicochemical characterization and release behavior of the inclusion complex of trans-anethole and β -cyclodextrin. **Food Research International**, v. 74, p. 55-62.

Znini, M., Cristofari, G., Majidi, L., Paolini, J., Desjobert, J.M., Costa, J., 2013. Essential oil composition and antifungal activity of *Pulicaria mauritanica* Coss., against postharvest phytopathogenic fungi in apples. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, p. 564-569.

Zuidam, N.J., Shimoni, E. Overview of microencapsulates for use in food products or process and methods to make them. In: **Encapsulation Technologies For Active Food Ingredients and Food Processing**. New York: SPRINGER, 2009. 38