



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE MENTA INCORPORADO EM COBERTURAS
COMESTÍVEIS À BASE DE GELATINA PARA APLICAÇÃO
EM MORANGO (*Fragaria x ananassa*)**

**LAURA SCARTAZZINI
Engenheira de Alimentos
MSc. Engenharia de Alimentos**

**Florianópolis/SC
2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

Laura Scartazzini

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE MENTA INCORPORADO EM COBERTURAS
COMESTÍVEIS À BASE DE GELATINA PARA APLICAÇÃO
EM MORANGO (*Fragaria x ananassa*)**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos como requisito à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alcilene
Rodrigues Monteiro Fritz
Coorientador: Prof. Dr. Marco Di
Luccio

**Florianópolis/SC
2018**

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

Scartazzini, Laura

Estudo da Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de Menta Incorporado em Coberturas Comestíveis á Base de Gelatina para Aplicação em Morango (*Fragaria x ananassa*) / Laura Scartazzini ; Orientadora, Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz ; coorientador, Marco Di Luccio

174 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. morango. 3. cobertura comestível de gelatina. 4. óleo essencial de menta. 5. nanoemulsão. I. Fritz, Alcilene Rodrigues Monteiro. II. Di Luccioi, Marcos. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE MENTA INCORPORADO EM COBERTURAS
COMESTÍVEIS À BASE DE GELATINA PARA APLICAÇÃO
EM MORANGO (*Fragaria x ananassa*)**

Por

Laura Scartazzini

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia de Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof^ª. Dr^ª. Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz

Prof. Dr. Marco Di Luccio

Prof^ª. Dr^ª. Sandra Regina Salvador Ferreira

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz

Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Fagundes

Dr^ª. Alessandra Valério

Dr^ª. Jaqueline de Oliveira Moraes

Florianópolis 16 de agosto de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, por não me deixar desanimar nem me esquecer Dele em nenhum momento.

Aos meus orientadores Alcilene R. M. Fritz e Marco Di Luccio, por todo apoio, confiança e dedicação para realização deste trabalho. Por mostrarem a importância do intercâmbio entre universidades através do Projeto Casadinho realizado na UNICAMP. Pela paciência nas tantas dúvidas que tive durante o mestrado e doutorado.

Aos meus pais, Primo E. Scartazzini e Nilse T. Scartazzini, por todo amor, carinho e ensinamentos durante esses 29 anos de vida. Por me mostrarem o verdadeiro amor e nunca deixarem de confiar nos meus passos.

Ao meu irmão, Cássio Scartazzini, pelo carinho, por acreditar em minha caminhada acadêmica e sempre me perguntar: “Quando você vai parar de estudar, vei?”.

Ao meu namorado, Felipe F. Brustolin, pelo amor, carinho e dedicação ao nosso relacionamento. Por me dar forças sempre e aguentar minhas preocupações. Por nunca me deixar desanimar nos momentos difíceis. A sua família que a cada dia é mais especial para mim, com todo carinho e compreensão.

A minha prima, Letícia Scartazzini, que me abrigou no comecinho do mestrado e que hoje temos uma relação de amizade muito gostosa.

Aos colegas do laboratório PROFI e de todos os outros laboratórios do EQA, pela amizade, pelos ensinamentos, opiniões, ajudas, e pelas festinhas em comemoração às conquistas de cada um.

Aos amigos, que mesmo distantes se fizeram presentes, por cada palavra, visita, carinho e apoio ao longo dessa caminhada.

Às minhas amigas e vizinhas, Jacqueline, Flávia e Marla Mateus, que desde a graduação até hoje, seguimos o mesmo caminho. E sabemos como é bom ter amigos. Ao meu vizinho e primo, Thalles C. Trevisol, pela aproximação que a pós-graduação nos proporcionou, aumentando ainda mais nossos laços familiares.

A todos, que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Os frutos do morango apresentam curto período pós-colheita, cujas principais causas são a sua intensa atividade metabólica e alta incidência por fungos deteriorantes, como *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer*, o que gera significativas perdas econômicas desse produto. O uso do óleo essencial de menta (OEM) aplicado em coberturas comestíveis à base de gelatina surge como alternativa no controle fitopatogênico, minimizar injúrias físicas e alterações químicas, substituir aditivos sintéticos, aumentando sua vida útil. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade do OEM contra o desenvolvimento de fungos quando adicionado em diferentes coberturas comestíveis à base de gelatina aplicadas em morango. Inicialmente, foram incorporados nas soluções filmogênicas à base de gelatina diferentes concentrações de OEM (0; 0,06; 0,13; 0,25; 0,38; 0,50 % (g/g gelatina)) e as coberturas foram caracterizadas quanto às propriedades de barreira, mecânicas, estruturais e capacidade antifúngica na forma de filmes obtidos por *casting*. As diferentes concentrações do OEM nos filmes proporcionaram aumento da barreira ao vapor de água, aumento da espessura, menor transparência e maior opacidade. Concentrações acima de 0,38 % de óleo resultaram em filmes mais frágeis e menos homogêneos na superfície. O OEM interferiu na organização molecular da matriz dos filmes e apresentou capacidade inibitória para *B. cinerea* e *R. stolonifer* somente na maior concentração (0,50 %). Observou-se que a atividade do OEM foi reduzida pela incorporação direta na matriz proteica das coberturas, podendo ser devido à sua volatilização na etapa de produção e secagem dos filmes. Para aumentar o potencial antifúngico e estabilidade, o OEM foi incorporado nas coberturas na forma de nanoemulsão (0; 0,06; 0,13; 0,25; 0,38; 0,50 % (g/g gelatina)), e os filmes caracterizados como descrito na primeira etapa. Os filmes adicionados das diferentes concentrações de nanoemulsão do óleo essencial de menta (NOEM) foram mais espessos, menos transparentes e mais opacos que o controle. A NOEM incorporada proporcionou melhor distribuição das partículas de óleo, resultando em filmes mais lisos e homogêneos, aumentou a barreira ao vapor de água e gerou filmes mais elásticos e menos rígidos. A organização molecular da matriz dos filmes foi alterada pela adição da NOEM. A capacidade antifúngica dos filmes para *B. cinerea* e *R. stolonifer* foi maior com a incorporação da NOEM nas concentrações de 0,25, 0,38 e 0,50 %. Posterior às caracterizações dos filmes, foi avaliada a influência do OEM e da NOEM nas coberturas comestíveis aplicadas em morangos inoculados com *B. cinerea* e *R. stolonifer* e os frutos foram avaliados em

relação ao desenvolvimento fúngico, taxa de respiração, produção de etileno e firmeza. As coberturas comestíveis com concentrações acima de 0,25 % de óleo, tornaram a superfície dos morangos escuras e amolecidas logo após aplicação. O desenvolvimento dos fungos foi influenciado pela aplicação das coberturas adicionadas das menores concentrações de OEM e de NOEM e reduziram a taxa de respiração dos morangos e a produção de etileno comparados ao controle. A firmeza dos morangos foi afetada negativamente pelas concentrações de 0,13 % de óleo de menta nas coberturas, enquanto que 0,06 % de óleo nas coberturas mantiveram melhor a firmeza dos morangos, sendo a cobertura A₁ (0,06 % OEM) escolhida para revestimento dos morangos. A vida útil de morangos higienizados com irradiação ultravioleta de onda curta (UV-C) e aplicados da cobertura comestível A₁ (0,06 %) foi avaliada quanto ao desenvolvimento fúngico, perda de massa, cor, firmeza, taxa de respiração, pH, sólidos solúveis totais, açúcares, ácidos orgânicos, capacidade antioxidante, compostos fenólicos totais e antocianinas totais. Os morangos revestidos com cobertura contendo 0,06 % OEM apresentaram redução ao desenvolvimento fúngico. A perda de massa e a taxa de respiração também foram mais baixas quando comparadas aos frutos sem cobertura. O OEM na cobertura não mostrou efeito negativo na cor e na firmeza dos morangos. Além disso, o uso da cobertura A₁ (0,06 % OEM) mostrou os melhores resultados quanto ao pH, SST, açúcares, ácidos orgânicos, capacidade antioxidante e compostos fenólico dos morangos durante 8 dias, armazenados a 6 °C e 95 % UR. O uso do OEM como agente antifúngico natural em cobertura comestível à base de gelatina mostrou ter potencialidade para manutenção da qualidade físico-química e no controle da senescência de morangos.

PALAVRAS-CHAVE: morango, cobertura comestível de gelatina, óleo essencial de menta, nanoemulsão, higienização com luz UV-C.

ABSTRACT

Strawberry fruits have a short post-harvest period, whose main causes are their intense metabolic activity and high incidence by deteriorating fungi, such as *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer*, which generated significant economic losses of this product. The use of mint essential oil (MEO) applied to gelatin based edible coating appears as an alternative in phytopathogenic control, minimizing physical injury and chemical changes, replacing synthetic additives, increasing their shelf life. Therefore, the objective of this study was to evaluate the activity of the MEO against the development of fungi, when added in different gelatin based edible coatings on strawberry. Initially, different concentrations of MEO (0, 0.06, 0.13, 0.25, 0.38, 0.50 % (g/g gelatin) were incorporated into gelatin-based film-forming solutions and the coatings were characterized a mechanical properties, structural and antifungal properties of films obtained by casting. The different concentrations of the MEO in the films provided increased water vapor barrier, increased thickness, lower transparency and higher opacity. Concentrations above 0.38 % of oil resulted in films that were more fragile and less homogeneous on the surface. The MEO interfered in the molecular organization of the films matrix and showed inhibitory capacity for *B. cinerea* and *R. stolonifer* only at the highest concentration (0.50 %). It was observed that the activity of the MEO was reduced by the direct incorporation into the protein matrix of the coatings, and may be due to its volatilization in the stage of production and drying of the films. To increase the antifungal potential and stability, MEO was incorporated into the coatings in the form of nanoemulsion (0, 0.06, 0.13, 0.25, 0.38, 0.50 % (g MEO/ g gelatin)), and the films characterized as described in the first stage. The films added from the different concentrations of nanoemulsion of mint essential oil (NMEO) were thicker, less transparent and more opaque than the control. The films added from the different concentrations of nanoemulsion of mint essential oil (NMEO) were thicker, less transparent and more opaque than the control. The incorporated NMEO provided a better distribution of the oil particles, resulting in smoother and homogeneous films, increased water vapor barrier and generated more elastic and less rigid films. The molecular

organization of the matrix of the films was altered by the addition of NMEO. The antifungal capacity of the films for *B. cinerea* and *R. stolonifer* was higher with the incorporation of NMEO at the concentrations of 0.25, 0.38 and 0.50 %. After the characterization of the films, the influence of the MEO and the NMEO on the edible coverages applied on strawberries inoculated with *B. cinerea* and *R. stolonifer* were evaluated and the fruits were evaluated in relation to fungal development, respiration rate, ethylene production and firmness. The edible toppings with concentrations above 0.25 % oil, made the surface of the strawberries dark and softened shortly after application. O desenvolvimento dos fungos foi influenciado pela aplicação dos revestimentos adicionados às menores concentrações de MEO e NMEO e reduziu a taxa de respiração dos morangos e a produção de etileno em relação ao controle. A firmeza dos morangos foi afetada negativamente pelas concentrações de 0,13 % de óleo de menta nas coberturas, enquanto 0,06v% do óleo nas coberturas manteve melhor a firmeza dos morangos, a cobertura A₁ (0,06 % MEO) foi escolhida para revestimento de morangos. The shelf life of strawberries sanitized with short-wave ultraviolet irradiation (UV-C) and applied from the edible cover A₁ (0.06 %) was evaluated for fungal development, loss of mass, color, firmness, respiration rate, pH, total soluble solids, sugars, organic acids, antioxidant capacity, total phenolic compounds and total anthocyanins. Covered strawberries containing 0.06 % MEO presented reduction to fungal development. Mass loss and respiration rate were also lower when compared to uncovered fruits. The MEO on the edible cover showed no negative effect on the color and firmness of the strawberries. In addition, the use of A₁ coverage (0.06 % MEO) showed the best results for pH, SST, sugars, organic acids, antioxidant capacity and phenolic compounds of strawberries for 8 days, stored at 6 °C and 95 % RH . The use of the MEO as a natural antifungal agent in gelatin-based edible cover showed potential for maintenance of the physico-chemical quality and control of senescence of strawberries.

KEYWORDS: strawberry, gelatin edible coating, mint essential oil, nanoemulsion, UV-C light sanitization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Espectro de radiação eletromagnética com divisão do espectro de luz visível e luz UV em três diferentes tipos.....	45
Figura 3.1 – Microscopia eletrônica de varredura dos filmes de gelatina incorporados com óleo essencial de menta (OEM) em diferentes concentrações. Superfície superior (a) e Fratura transversal (b).....	78
Figura 3.2 – Microscopia confocal de varredura a laser dos filmes de gelatina incorporados com óleo essencial de menta (OEM) em diferentes concentrações. Barra indicativa de tamanho representa 25 μm	80
Figura 3.3 – Espectros de infravermelho dos filmes de gelatina incorporados com óleo essencial de menta (OEM) em diferentes concentrações.....	83
Figura 3.4 – Ângulos de contato dos líquidos padrões água, formamida e diiodometano sobre os filmes de gelatina incorporados com óleo essencial de menta (OEM) em diferentes concentrações.....	84
Figura 3.5 – Molhabilidade dos filmes com os líquidos padrões: água (a), formamida (b) e diiodometano (c).....	85
Figura 4.1 – Microscopia eletrônica de varredura dos filmes de gelatina incorporados com nanoemulsão do óleo essencial de menta (NOEM) em diferentes concentrações. Superfície superior (a) e Fratura transversal (b).....	106
Figura 4.2 – Microscopia confocal de varredura a laser dos filmes de gelatina incorporados com nanoemulsão do óleo essencial de menta (NOEM) em diferentes concentrações. Barra indicativa de tamanho representa 25 μm	108
Figura 4.3 – Espectros de infravermelho dos filmes de gelatina incorporados com nanoemulsão do óleo essencial de menta (NOEM) em diferentes concentrações.....	110
Figura 4.4 – Ângulos de contato dos líquidos padrões água, formamida e diiodometano sobre os filmes de gelatina incorporados com nanoemulsão do óleo essencial de menta (NOEM) em diferentes concentrações.....	112
Figura 5.1 – Câmara UV-C refrigerada.....	125

Figura 5.2 – Desenvolvimento fúngico de morangos inoculados sem cobertura e com cobertura armazenados a 15 °C e 95 % UR. (■ Controle, ▲ A₀ (sem OEM), ● A₁ (0,06 %), × A₂ (0,13 %), ◆ N₁ (0,06 %) e ■ N₂ (0,13 %). Valores médios e intervalos de 95 % de HSD pelo teste de Tukey.....132

Figura 5.3 – Evolução da concentração de O₂ e CO₂ de morangos inoculados sem cobertura e com coberturas, durante 24 h de armazenamento a 15 °C. (■ Controle, ▲ A₀ (sem OEM), ● A₁ (0,06 %), × A₂ (0,13 %), ◆ N₁ (0,06 %) e ■ N₂ (0,13 %). Valores médios e intervalos de 95 % de HSD pelo teste de Tukey.....134

Figura 5.4 – Taxa do consumo de O₂ e produção de CO₂ de morangos inoculados sem cobertura e com coberturas, no tempo de 24 h de armazenamento a 15 °C.....135

Figura 5.5 – Produção de etileno de morangos inoculados sem cobertura e com coberturas, durante 24 h de armazenamento a 15 °C. (■ Controle, ▲ A₀ (sem OEM), ● A₁ (0,06 %), × A₂ (0,13 %), ◆ N₁ (0,06 %) e ■ N₂ (0,13 %). Valores médios e intervalos de 95 % de HSD pelo teste de Tukey.....137

Figura 5.6 – Força de perfuração de morangos inoculados sem cobertura e com coberturas armazenados a 15 °C e 95 % UR. (■ Controle, ▲ A₀ (sem OEM), ● A₁ (0,06 %), × A₂ (0,13 %), ◆ N₁ (0,06 %) e ■ N₂ (0,13 %). Valores médios e intervalos de 95 % de HSD pelo teste de Tukey.....140

Figura 5.7 – Desenvolvimento fúngico de morangos sem e com cobertura à base de gelatina e OEM, armazenados a 6 °C e 95 % UR. (■ Controle, ▲ UVC (sem cobertura), × A₀ (sem OEM), ● A₁ (0,06 % OEM). Valores médios e intervalos de 95 % de HSD pelo teste de Tukey.....143

Figura 5.8 – Perda de massa de morangos sem e com cobertura à base de gelatina e OEM, armazenados a 6 °C e 95 % UR. (■ Controle, ▲ UVC (sem cobertura), × A₀ (sem OEM), ● A₁ (0,06 % OEM). Valores médios e intervalos de 95 % de HSD pelo teste de Tukey.....144

Figura 5.9 – Firmeza de morangos sem e com cobertura à base de gelatina e OEM, armazenados a 6 °C e 95 % UR. (—■— Controle, —▲— UVC (sem cobertura), —×— A₀ (sem OEM), —●— A₁ (0,06 % OEM)). Valores médios e intervalos de 95 % de HSD pelo teste de Tukey.....148

Figura 5.10 – Evolução da concentração de O₂ e CO₂ de morangos sem e com cobertura à base de gelatina e OEM, durante 96 h de armazenamento a 6 °C e 95 % UR. (—■— Controle, —▲— UVC (sem cobertura), —×— A₀ (sem OEM), —●— A₁ (0,06 % OEM)). Valores médios e intervalos de 95 % de HSD pelo teste de Tukey.....150

Figura 5.11 – Taxa do consumo de O₂ e produção de CO₂ de morangos sem e com cobertura à base de gelatina e OEM, no tempo de 96 h de armazenamento a 6 °C e 95 % UR.....151

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Produção mundial de morango no ano de 2014.....	29
Tabela 2.2 – Resumo de trabalhos recentes da literatura sobre aplicação de coberturas comestíveis em alimentos fazendo o uso de diferentes matérias-primas e técnicas pós-colheita.....	34
Tabela 3.1 – Espessura, Transparência, Opacidade e PVA dos filmes de gelatina incorporados com óleo essencial de menta (OEM) em diferentes concentrações.....	75
Tabela 3.2 – Resistência à tração, alongação e módulo de Young dos filmes de gelatina incorporados com óleo essencial de menta (OEM) em diferentes concentrações.....	76
Tabela 3.3 – Energia livre superficial, componente polar e componente dispersiva dos ângulos de contato sobre os filmes de gelatina incorporados com óleo essencial de menta (OEM) em diferentes concentrações.....	86
Tabela 4.1 – Tamanho de Partícula, Índice de Polidispersão (PDI) e Potencial Zeta da nanoemulsão do óleo essencial de menta.....	99
Tabela 4.2 – Espessura, Transparência, Opacidade e PVA dos filmes de gelatina incorporados com nanoemulsão do óleo essencial de menta (NOEM) em diferentes concentrações.....	102
Tabela 4.3 – Tensão de ruptura, alongação e módulo de Young dos filmes de gelatina incorporados com nanoemulsão do óleo essencial de menta (NOEM) em diferentes concentrações.....	104
Tabela 4.4 – Energia livre superficial, componente polar e componente dispersiva dos ângulos de contato sobre os filmes de gelatina incorporados com nanoemulsão do óleo essencial de menta (NOEM) em diferentes concentrações.....	113
Tabela 5.1 – Cor de morangos sem e com cobertura à base de gelatina e OEM, armazenados a 6 °C e 95 % UR.....	146
Tabela 5.2 – pH e Sólidos Solúveis Totais (SST) de morangos sem e com cobertura à base de gelatina e OEM, armazenados a 6 °C e 95 % UR....	153
Tabela 5.3 – Açúcares e ácidos orgânicos de morangos sem e com cobertura à base de gelatina e OEM, armazenados a 6 °C e 95 % UR....	155

Tabela 5.4 – Capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais de morangos sem e com cobertura à base de gelatina e OEM, armazenados a 6 °C e 95 % UR.....159

Tabela 5.5 – Antocianinas totais de morangos sem e com cobertura à base de gelatina e OEM, armazenados a 6 °C e 95 % UR.....161

SUMÁRIO

CAPITULO 1. INTRODUÇÃO	25
1.1. Objetivo geral.....	26
1.2. Objetivos específicos	26
1.4. Referências Bibliográficas	27
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 Morango.....	31
2.2 Óleos Essenciais.....	38
2.2.1 Óleo Essencial de Menta.....	39
2.2.2 Nanoemulsão de Óleos Essenciais	40
2.3 Coberturas Comestíveis	42
2.4 Gelatina	46
2.5 UV-C.....	47
2.6 Referências Bibliográficas	48
CAPÍTULO 3. CARACTERIZAÇÃO DE COBERTURAS COMESTÍVEIS À BASE DE GELATINA ADICIONADAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE MENTA (MENTHA ARVENSIS).....	67
Resumo	67
3.1 Introdução	67
3.2. Material e Métodos	69
3.2.1. Materiais	69
3.2.2. Formulação e preparo das coberturas comestíveis.....	69
3.2.3. Caracterização dos filmes	70
3.2.3.1 Espessura	70
3.2.3.2 Opacidade	70
3.2.3.3 Transparência.....	70
3.2.3.4 Permeabilidade ao Vapor de Água	70
3.2.3.5 Propriedades Mecânicas	71
3.2.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	71

3.2.3.7 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL) ..	71
3.2.3.8 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)	72
3.2.3.9 Ângulo de Contato e Energia Livre Superficial.....	72
3.2.3.10 Capacidade Antifúngica	73
3.2.3.11 Análises Estatísticas	74
3.3. Resultados e Discussão.....	74
3.3.1 Espessura, Transparência e Opacidade.....	74
3.3.2 Permeabilidade ao Vapor de Água	75
3.3.3 Propriedades Mecânicas	77
3.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	78
3.3.5 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)	81
3.3.6 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)	83
3.3.7 Ângulo de Contato, Energia Livre Superficial e Molhabilidade	85
3.3.8 Capacidade antifúngica.....	88
3.4. Conclusão	89
3.5. Referências Bibliográficas	90
CAPÍTULO 4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E CAPACIDADE ANTIFÚNGICA DE COBERTURAS COMESTÍVEIS À BASE DE GELATINA ADICIONADAS DE NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE MENTA (<i>Mentha arvensis</i>).....	95
Resumo	97
4.1 Introdução.....	97
4.2 Material e Métodos	99
4.2.1 Material.....	99
4.2.1 Preparo da nanoemulsão do óleo essencial de menta	99
4.2.2 Caracterização da nanoemulsão.....	99
4.2.2.1 Tamanho de Partícula, Polidispersão, Potencial Zeta e Capacidade antifúngica	99
4.2.3 Preparo das coberturas comestíveis com NOEM.....	100

4.2.4	Caracterização das coberturas comestíveis com NOEM....	100
4.2.5	Análises Estatísticas.....	100
4.3	Resultados e Discussão.....	100
4.3.1	Caracterização da nanoemulsão: Tamanho de Partícula, Polidispersão, Potencial Zeta e Capacidade antifúngica da NOEM.....	100
4.3.2	Espessura, Transparência e Opacidade.....	101
4.3.3	Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA).....	103
4.3.4	Propriedades Mecânicas.....	104
4.3.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	106
4.3.6	Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL).....	109
4.3.7	Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).....	110
4.3.8	Ângulo de Contato e Energia Livre Superficial.....	113
4.3.9	Capacidade Antifúngica.....	115
4.4	Conclusão.....	116
4.5	Referências Bibliográficas.....	117

CAPÍTULO 5. APLICAÇÃO DE COBERTURAS COMESTÍVEIS À BASE DE GELATINA ADICIONADAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE MENTA EM MORANGOS (*Fragaria x ananassa*): AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E INFLUÊNCIA NA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DO FRUTO..... 119

	Resumo.....	121
5.1	Introdução.....	122
5.2	Material e Métodos.....	123
5.2.1	Material e matéria-prima.....	123
5.2.2	Preparo das soluções de cobertura comestível.....	124
5.2.3	Incorporação de OEM e NOEM nas coberturas e sua influência no desenvolvimento fúngico de morangos inoculados com <i>B. cinerea</i> e <i>R. stolonifer</i>	124
5.2.3.4	Desenvolvimento Fúngico Visual.....	125
5.2.3.5	Taxa de Respiração.....	125

5.2.3.6	Produção de Etileno.....	125
5.2.3.7	Firmeza	126
5.2.4	Revestimento de morangos sanitizados por luz UV-C	126
5.2.4.1	Sanitização por luz UV-C.....	127
5.2.4.2	Aplicação do revestimento	127
5.2.4.3	Caracterização físico-química dos morangos	128
5.2.5	Análise Estatística.....	132
5.3	Resultados.....	132
5.3.1	Influência do OEM e NOEM das coberturas comestíveis aplicadas em morangos inoculados.....	132
	<i>Desenvolvimento Fúngico Visual</i>	133
	<i>Taxa de Respiração</i>	135
	<i>Produção de Etileno</i>	138
	<i>Firmeza</i>	140
5.3.2	Revestimento de morangos sanitizados por luz UV-C	143
	<i>Desenvolvimento Fúngico Visual</i>	143
	<i>Perda de Massa</i>	145
	<i>Cor</i>	146
	<i>Firmeza</i>	149
	<i>Taxa de Respiração</i>	150
	<i>pH e Sólidos Solúveis Totais (SST)</i>	153
	<i>Açúcares e Ácidos Orgânicos</i>	156
	<i>Capacidade Antioxidante e Compostos Fenólicos Totais</i>	159
	<i>Antocianinas Totais</i>	162
5.4	Conclusão	164
5.5	Referências Bibliográficas	164
CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES FINAIS.....		173

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MENTA INCORPORADO EM COBERTURAS COMESTÍVEIS À BASE DE GELATINA PARA APLICAÇÃO EM MORANGO (*Fragaria x ananassa*)

Por quê?

- O morango tem curto período de vida útil, devido principalmente a sua sensibilidade a danos físicos e desenvolvimento de fungos
- Óleos essenciais (OE) possuem propriedades antimicrobianas naturais e propriedades funcionais que contribuem para aumentar a vida útil de frutos e hortaliças
- Coberturas comestíveis incorporadas de ingredientes ativos podem ser usadas como alternativas para prolongar vida útil e manter a qualidade de frutos *in natura* e minimamente processados
- O uso de irradiação UV-C na etapa de higienização dos morangos

O que já existe?

- Não há trabalhos sobre a atividade antifúngica do óleo essencial de menta incorporado em coberturas comestíveis à base de gelatina para morangos
- O OEM tem sido utilizado de forma eficaz na inativação de fungos isolados de morangos, como o *B. cinerea* e *R. stolonifer*
- Extensão da vida útil de morangos utilizando revestimentos de carboximetilcelulose, quitosana com óleo essencial de *Mentha spicata*
- Incorporação de nanoemulsões de OE em coberturas comestíveis de diferentes materiais tem mostrado aumentar a atividade antimicrobiana dos filmes pela redução da volatilização do constituinte
- Tecnologia de higienização de morangos com luz UV-C é capaz de reduzir a contaminação microbiana e estender o tempo de vida útil do fruto

Hipóteses

- A adição do OEM em cobertura comestível proporciona ação antifúngica e reduz a taxa de permeação de água
- Adição de nanoemulsão de OEM pode proporcionar melhor estabilidade, distribuição, atividade biológica e minimizar propriedades sensoriais, podendo assim reduzir as quantidades de óleo utilizado
- O uso de cobertura comestível de gelatina adicionada de agente antifúngico natural (OEM) em morangos pode aumentar o tempo de vida útil do fruto no comércio

Metodologia experimental

- Formulação e caracterização de coberturas à base de gelatina com diferentes concentrações de OEM pelo método de *casting*
- Desenvolvimento de nanoemulsão do OEM e incorporação em soluções de cobertura à base de gelatina e caracterização das mesmas
- Influência do OEM e NOEM nas coberturas comestíveis aplicadas em morangos inoculados com *B. cinerea* e *R. stolonifer* e avaliação da qualidade físico-química do fruto higienizado com UV-C e aplicado de cobertura comestível

Respostas

- Melhora das propriedades de barreira, mecânica, estruturais e capacidade antifúngica das coberturas comestíveis de gelatina com diferentes concentrações de OEM
- Melhora da distribuição do OEM (nanoemulsão) nas coberturas tendo como consequência modificação de suas propriedades de barreira, mecânica, estruturais e aumento da sua capacidade antifúngica
- Morangos de qualidade com maior tempo de vida útil pelo uso de coberturas comestíveis adicionadas de OEM

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

Os morangos (*Fragaria x ananassa*), ricos em sabor e valor nutricional, são normalmente comercializados e consumidos frescos. Porém, conservar suas características pós-colheita por longos períodos de tempo são etapas difíceis do processo. Mesmo sob baixas temperaturas de armazenamento, o tempo de validade estimado dos morangos, geralmente, não ultrapassa cinco dias, o que gera perdas de até 40 % do produto. Sua alta perecibilidade é caracterizada pela intensa atividade fisiológica, desidratação, danos mecânicos e deterioração microbiana (CAMPANIELLO, et al., 2008; CANER, ADAY e DEMIR, 2008; PARETTO et al., 2014).

As coberturas comestíveis de diferentes materiais desempenham papel fundamental para a conservação de frutos e hortaliças, e quando enriquecidas com antimicrobiano natural têm se mostrado eficientes na preservação da qualidade durante o armazenamento desses produtos (GUERRA et al., 2015; GUERREIRO et al., 2015; DONSI e FERRARI, 2016; SHAHBAZI, 2018). A gelatina é o material preferido para formação de películas pelas suas propriedades inodora e incolor, por apresentar baixo custo e alta biodegradabilidade (WENG e ZHENG, 2015).

Em relação à incorporação de antimicrobianos em películas comestíveis, os preferidos pelas pesquisas recentes, são os compostos hidrofóbicos e não sintéticos, como os óleos essenciais, pois apresentam melhorias quanto às propriedades de barreira e são seguros à saúde (CALO et al., 2015). O OEM (*Mentha arvensis*), volátil, de sabor e odor característico, é rico em mentol, composto responsável pela atividade antimicrobiana que pode variar em sua concentração dependendo da cultivar, método de extração e armazenamento. Como alternativa aos conservantes e pesticidas químicos, o óleo essencial de menta apresenta atividade contra diversos fungos e bactérias presentes em frutos e plantas do morangueiro (TIWARI, 2016; COMBRINCK, REGNIER e KAMATOU, 2011; GUERRA et al., 2015). Essa atividade antimicrobiana, assim como outras atividades biológicas dos óleos essenciais estão ligadas diretamente com seus componentes voláteis, os quais precisam ter maior atenção quando incorporados nas coberturas comestíveis para alimentos, pois matrizes complexas podem diminuir a eficácia dos óleos essenciais (CALO et al., 2015; BURT, 2004).

A nanoemulsão é uma tecnologia capaz de melhorar a estabilidade e atividade biológica pelo aumento da área de superfície, proporcionando melhor distribuição na matriz filmogênica, reduzindo as

propriedades sensoriais e de volatilidade dos óleos essenciais (CALO et al., 2015; DONSI e FERRARI, 2016).

A irradiação UV-C é uma tecnologia não térmica que vem sendo estudada como alternativa de higienização de frutas e hortaliças para redução da carga microbiana e retardo da senescência pós-colheita. Além disso, o UV-C pode reduzir a carga microbiana inicial do fruto, e dessa forma aumentar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais adicionados em coberturas comestíveis, devido ao efeito sinérgico entre os tratamentos (RASO e BARBOSA-CÂNOVAS, 2003). A ação germicida do UV-C tem como principal alvo o material genético dos microrganismos, não apresentando toxicidade e nem deixando resíduos químicos nos alimentos, além de ser uma tecnologia de baixo custo (SHIN, SONG e SONG, 2012).

A proposta do presente trabalho visa aumentar a vida útil de morangos quando aplicados de coberturas comestíveis à base de gelatina adicionadas do óleo essencial de menta como agente antifúngico natural.

1.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a atividade antifúngica do OEM adicionado em coberturas comestíveis à base de gelatina para aplicação em morango visando estender sua vida útil.

1.2. Objetivos específicos

- Produzir e caracterizar coberturas comestíveis à base de gelatina adicionadas de diferentes concentrações do OEM quanto às propriedades de barreira, propriedades mecânicas, estruturais e capacidade antifúngicas
- Desenvolver nanoemulsão do OEM e a incorporar nas coberturas à base de gelatina para melhorar a estabilidade e capacidade antifúngicas.
- Caracterizar as coberturas contendo NOEM quanto às propriedades de barreira, propriedades mecânicas, estruturais e de capacidade antifúngicas

- Aplicar as coberturas comestíveis à base de gelatina contendo OEM e NOEM em morangos e avaliar a influência contra *B. cinerea* e *R. stolonifer*, na taxa respiratória, produção de etileno e firmeza dos morangos
- Avaliar a influência de cobertura comestível à base de gelatina e óleo essencial de menta na qualidade físico-química de morangos higienizados com UV-C

O documento está organizado na sequência apresentada abaixo na forma de capítulos.

- Capítulo 1 – Introdução
- Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica
- Capítulo 3 – Caracterização de coberturas comestíveis à base de gelatina adicionadas de óleo essencial de menta (*Mentha arvensis*)
- Capítulo 4 – Caracterização físico-química e capacidade antifúngica de coberturas comestíveis à base de gelatina adicionadas de nanoemulsão de óleo essencial de menta (*Mentha arvensis*)
- Capítulo 5 – Aplicação de coberturas comestíveis à base de gelatina adicionadas de óleo essencial de menta em morango (*Fragaria x ananassa*): avaliação da atividade antifúngica e influência na qualidade físico-química do fruto
- Capítulo 6 – Conclusões Finais Geral

1.4. Referências Bibliográficas

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

CALO, J. R., CRANDALL, P. G., O'BRYAN, C. A., RICKE, S. C. **Essential oils as antimicrobials in food systems e A review.** Food Control, v. 54, p.111 - 119, 2015.

CAMPANIELLO, D., BEVILACQUA, A., SINIGAGLIA, M., CORBO, M. R. **Chitosan: Antimicrobial activity and potential applications for preserving minimally processed strawberries.** *Food Microbiology*, v. 25, p. 992–1000, 2008.

CANER, C., ADAY, M. S., DEMIR, M. **Extending the quality of fresh strawberries by equilibrium modified atmosphere packaging.** *European Food Research Technology*, v. 227, p. 1575–1583, 2008.

CONBRINCK, S., REGNIER, T., KAMATOU, G. P. P. **In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit.** *Industrial Crops and Products*, v. 33, p. 344–349, 2011.

DONSÌ, F., FERRARI G. **Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food.** *Journal of Biotechnology*, v. 233, p. 106–120, 2016.

GUERRA, I. C. D., OLIVEIRA, P. D. DE, PONTES, A. L. S., LÚCIO, A. S. S. C., TAVARES, J. F., BARBOSA-FILHO, J. M., MADRUGA, M. S., E. L. DE. **Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha × villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 214, p. 168–178, 2015.

GUERREIRO, A. C., GAGO, C. M. L., FALEIRO, M. L., MIGUEL, M. G. C., ANTUNES, M. D. C. **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, 2015.

KAMATOU, G. P. P., VERMAAK, I., VILJOEN, A. M., LAWRENCE, B. M. **Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties.** *Phytochemistry*, v. 96, p. 15–25, 2013.

PERETTO, G., DU, W., AVENA-BUSTILLOS, R. J., SARREAL, S. B. L., HUA, S. S. T., SAMBO, P., MCHUGH, T. H. **Increasing strawberry shelf-life with carvacrol and methyl cinnamate antimicrobial vapors**

released from edible films. *Postharvest Biology and Technology*, v. 89, p. 11–18, 2014.

RASO, J., BARBOSA-CÀNOVAS, V. **Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 43, p. 265–285, 2003.

SHAHBAZI, Y. **Application of carboxymethyl cellulose and chitosan coatings containing *Mentha spicata* essential oil in fresh strawberries.** *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 112, p. 264–272, 2018.

SHIN, Y., SONG, H., SONG, K. B. **Effect of a combined treatment of rice bran protein film packaging with aqueous chlorine dioxide washing and ultraviolet-C irradiation on the postharvest quality of ‘Goha’ strawberries.** *Journal of Food Engineering*, v. 113, p. 374–379, 2012.

TIWARI, P. **Recent advances and challenges in trichome research and essential oil biosynthesis in *Mentha arvensis* L.** *Industrial Crops and Products*, v. 82, p. 141–148, 2016.

WENG, W., ZHENG, H. **Effect of transglutaminase on properties of tilapia scale gelatin films incorporated with soy protein isolate.** *Food Chemistry*, v. 169, p. 255–260, 2015.

CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Morango

O morango pertence à família Rosaceae do gênero *Fragaria* sendo a espécie *Fragaria x ananassa* Duch originária da América do Norte e Chile (SILVA et al., 2007). É considerado um pseudofruto não climatérico, suculento, de cor avermelhada e sabor acidificado (HENRIQUE e CEREDA, 1999; CHITARRA e CHITARRA, 2005). Dentre os cultivos de pequenos frutos, ele é considerado um dos mais importantes economicamente, vendido fresco ou processado (HANCOCK et al., 2008).

A produção mundial de morango no ano de 2014 foi de 8114373 toneladas, sendo que a região da América do Sul produziu cerca de 198535 toneladas, desse total o Brasil produziu 3257 toneladas. O país líder foi a China com 3113000 toneladas, seguido pelos Estados Unidos com 1371573 toneladas (FAO, 2014). Na Tabela 2.1 estão representados os dados da produção mundial de morango no ano de 2014.

Tabela 2.1 – Produção mundial de morango no ano de 2014.

Continente	Toneladas
Ásia	3964336
Américas	2064988
Europa	1598077
África	442271
Oceania	44701
Mundial	8114373

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dados: FAO, 2014.

A busca por produtos frescos e saudáveis vem ganhando atenção nos últimos anos pelos consumidores, os quais exigem alimentos de alta qualidade, seguros e prontos para o consumo. Neste contexto, surgem os alimentos minimamente processados, que tem como características a praticidade, proporcionando economia de tempo no preparo dos alimentos (MORAES et al., 2008). Nos mercados, é possível encontrar uma gama de produtos à base de morango disponível de formas

processadas, como sucos, polpas, desidratados, compotas e conservas, porém seus valores nutricionais e características sensoriais, muitas vezes, são reduzidos (MARSZALEK, MITEK e SKAPSKA, 2015; KOVACEVIC et al., 2015).

O morango, por sua vez, é um alimento altamente sensível e perecível, de intensa atividade metabólica, sujeito a danos mecânicos, alterações fisiológicas e principalmente sujeito a deterioração por fungos, sendo que os principais responsáveis são *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer*, tornando sua comercialização um grande desafio (FAN et al., 2009; VU et al., 2011; EL-MOGY e ALSANIUS, 2012).

A forma mais usual para a redução da deterioração do morango é o rápido arrefecimento do fruto após a colheita, sendo que sua vida útil não costuma passar dos 5 dias (0 – 4 °C) (GHAOUTH et al., 1991). Pesquisas sobre diversas técnicas de conservação do morango fresco ou minimamente processado têm sido apresentadas na literatura, fazendo uso da refrigeração, fungicidas químicos sintéticos e orgânicos, tratamentos osmóticos, tratamentos térmicos, tratamento com ultrassom, embalagens com atmosfera modificada, filmes e coberturas comestíveis, entre outros (WSZELAKI e MITCHAM, 2000; HARKER et al., 2000 ; HAN, et al., 2004; VICENTE, et al., 2005 ; ZHU e ZHOU, 2007; AN, PARK, e LEE, 2009 ; CASTELLO, FITO e CHIRALT, 2010 ; EL-MOGY e ALSANIUS, 2012; VELICKOVA et al., 2013; ADAY e CANER, 2013; ADAY et al., 2013; GUERREIRO et al., 2015; KORTE e FAVARÃO, 2016; OREGEL-ZAMUDIO et al. 2017).

Durante a maturação do morango ocorrem diversas alterações, como a perda da firmeza, que está relacionada à degradação de componentes da parede celular devido à ação de enzimas, como a celulase, xilosidase e galactosidase (MANNING 1993; CASTELLO, FITO e CHIRALT, 2010; ADAY et al., 2013). Guerreiro et al. (2015) relataram que a firmeza de morangos com diferentes coberturas comestíveis de alginato e pectina adicionados de óleos essenciais foi mantida, quando comparados com frutos controle. O efeito da cobertura pode funcionar como barreira contra deterioração por fungos, na redução da taxa de respiração e perda de água, fazendo com que a ação das enzimas seja reduzida, e consequentemente mantendo a firmeza do morango (VELICKOVA et al., 2013). Outros autores relataram o efeito benéfico da aplicação de coberturas comestíveis sobre a firmeza de morango (TANADA-PALMU e GROSSO, 2005; BORGES et al., 2013; VELICKOVA et al., 2013; VENTURA-AGUILAR et al., 2018).

A perda de água do morango para o ambiente externo pode resultar na perda de massa, alterações na firmeza e na aparência, devido

à evaporação da água dos tecidos pela transpiração do fruto (DUAN et al., 2011; VELICKOVA et al., 2013). A taxa limite para perda de massa do morango varia de 6 % a 10 % (NUNES et al., 1995). A perda de massa de morangos pode ser minimizada com o uso de baixas temperaturas e umidade relativa do ambiente maior que 90 % (VICENTE et al., 2002). A aplicação de coberturas comestíveis de diferentes materiais adicionados ou não de um agente hidrofóbico pode minimizar a perda de massa pela capacidade de formar uma barreira que impede a evaporação da água da superfície do fruto, mantendo a sua hidratação com o tempo de armazenamento, como relatado por diversos autores (TANADA-PALMU e GROSSO, 2005; HERNANDEZ-MUÑOZ et al., 2008; GOL et al., 2013; VELICKOVA et al., 2013; GUERREIRO et al., 2015; OREGEL-ZAMUDIO et al., 2017).

A cor vermelha característica do morango é um fator importante que influencia sua aparência visual. Ela é desenvolvida pela síntese de antocianinas, sendo que a principal é a pelargonidina-3-*O*-glicosídeo, possuindo capacidade antioxidante. Conforme o fruto do morango amadurece, ele tende a ficar mais escuro (KALT et al., 1993). Para Guerreiro et al. (2015), os parâmetros de cor avaliados nos frutos de morango com diferentes coberturas de alginato de sódio e pectina adicionados de diferentes concentrações dos óleos essenciais contendo citral e eugenol não foram significativos em termos de mudança de qualidade em relação aos frutos sem cobertura.

Velickova et al. (2013) avaliaram a mudança da cor dos morangos revestidos com diferentes coberturas de quitosana e cera de abelha, a qual aumentou apenas 3 vezes no final do armazenamento a 20 °C. Enquanto que, os sem cobertura aumentaram 4 e 6 vezes mais no terceiro e sétimo dia de armazenamento. Eles explicaram que, a ausência do revestimento provocou perda do líquido intracelular e colapso do tecido do morango.

Vargas et al. (2006) concluíram que os revestimentos comestíveis de quitosana e ácido oleico em morango resultaram em melhor preservação da cor durante o armazenamento a 4 °C. O oposto foi observado por Perdones et al. (2012) para revestimentos em morango com quitosana e óleo essencial de limão, que afetou os parâmetros de cor dos frutos armazenados à 5 °C.

Os sólidos solúveis totais (SST) no morango podem apresentar aumento durante seu amadurecimento. São representados pelos açúcares solúveis (frutose, glicose, sacarose) como componentes mais abundantes, seguido pelos ácidos orgânicos não voláteis. No estado maduro seu valor pode variar de 5 % até 12 % de SST, dependendo da cultivar e de fatores pré-colheita (FAMIANI et al., 2005). Tanada-Palmu e Grosso (2005),

Oregel-Zamudio et al. (2017) e Vargas et al. (2006) não verificaram diferença significativa nos valores de SST dos diferentes tratamentos com o tempo de armazenamento dos morangos revestidos.

A acidez titulável determina o percentual dos ácidos orgânicos no morango e o pH a concentração hidrogeniônica, e seus valores variam conforme o fruto amadurece. Os ácidos orgânicos podem ser utilizados pelas frutas como substrato na respiração ou conversão em açúcares, tendendo a diminuir com o tempo de armazenamento, o pH, conseqüentemente, aumenta, sendo um indicativo do estágio de maturação do morango (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

Korte e Favarão (2016) observaram aumento significativo do pH em relação aos tratamentos com coberturas de gelatina e extratos vegetais utilizados em morango quando comparado com o tratamento controle. A acidez titulável de morangos diminuiu com uso de revestimentos de gelatina e extratos vegetais em relação ao tratamento controle e ao revestimento composto só de gelatina. Oregel-Zamudio et al. (2017) observaram a diminuição dos valores de pH em todos os tratamentos com coberturas à base de goma guar, cera de candelilla e *Bacillus subtilis* em morango. O contrário foi relatado por Perdones et al. (2012), para tratamentos com morango sem e com revestimento de quitosana e óleo essencial de limão, em que os valores do pH e acidez titulável aumentaram com o tempo de armazenamento a 4 °C. Em outros estudos, o uso de revestimentos em morango não afetaram significativamente os valores de pH e acidez titulável (VARGAS et al., 2006; GOL et al., 2013; VALENZUELA et al., 2015).

O morango é um fruto não-climatérico, porém possui elevada taxa respiratória e baixa produção de etileno. Os fatores que afetam a taxa respiratória do morango são a cultivar, o estado de maturação, região de produção e temperaturas elevadas de armazenamento (CHITARRA e CHITARRA, 2005; VELICKOVA et al., 2013). Zhao et al. (2007) explicaram que valores elevados nas concentrações de dióxido de carbono em frutos indica o aumento na taxa respiratória e da degradação de ácidos orgânicos. O uso de coberturas comestíveis em frutos tem levado à redução da taxa de respiração, retenção da firmeza e controle do crescimento microbiano (FAN et al., 2009; VU et al., 2011; GARCIA et al., 2010; VELICKOVA et al., 2013).

O morango é muito susceptível ao ataque de fungos deteriorantes e o uso de coberturas comestíveis interfere ligeiramente na redução do desenvolvimento desses microrganismos sobre a superfície do fruto (VARGAS et al., 2006; FAN et al., 2009; VU et al., 2011; PERDONES et al., 2012; VELICKOVA et al., 2013). A explicação pode ser dada pela

barreira física que a cobertura comestível forma no fruto, e quando a cobertura é adicionada de agentes antimicrobianos sua ação pode ser potencializada. Perdones et al. (2012) observaram que os revestimentos de quitosana com e sem óleo de limão reduziram a porcentagem de morangos infectados em relação aos morangos não revestidos após 3 dias de armazenamento. De acordo com Vargas et al. (2006), os estudos mostraram que os revestimentos de quitosana retardaram o aparecimento de contaminação fúngica em comparação com morangos sem cobertura. Ao final do armazenamento, os morangos com cobertura apresentaram menos que 50 % de contaminação em relação aos morangos controle.

A avaliação físico-química do morango é de grande importância e se dá por meio de análises do tamanho, coloração, acidez, pH, firmeza, sólidos solúveis, açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, capacidade antioxidante, taxa respiratória, perda de massa e contaminação microbiológica. Todas essas análises permitem obter informações sobre a qualidade final do produto (SHINA et al., 2008).

Na Tabela 2.2 estão resumidos alguns trabalhos sobre aplicação de coberturas comestíveis em alimentos, fazendo o uso de diferentes materiais e técnicas pós-colheita. Todos os autores estudaram a aplicação de diferentes coberturas comestíveis em frutos para possibilitar estender o tempo de vida útil do produto. A maioria dos autores relataram melhoras das propriedades físico-químicas e microbiológicas com o uso das coberturas comestíveis nos frutos, quando comparados com os frutos sem recobrimento.

Tabela 2.2 - Resumo de trabalhos recentes da literatura sobre aplicação de coberturas comestíveis em alimentos, fazendo o uso de diferentes matérias-primas e técnicas pós-colheita.

Autores/ Ano	Alimento	Tratamento pós colheita	Base da cobertura	Óleo Essencial (OE)	Temp. armazenamento (°C)	Umidade Relativa (%)	Período de vida útil (dias)	Efeitos
Borges et al., (2013)	morango	hipoclorito de sódio	goma xantana	sálvia	4	88	12	Sem alteração do pH e cor, redução na perda de massa e fungos
Bill et al., (2014)	abacate	hipoclorito de sódio	goma arábica, aloe vera, quitosana	tomilho	20	-	5	Redução da antracnose. Redução da perda de cor e firmeza
Shahbazi (2018)	morango	hipoclorito de sódio	Carboximet il-celulose e quitosana	Mentha spicata	4	-	12	Menor perda de massa, contaminação microbiana e taxa de respiração. Não afetou aceitabilidade
Korte e Favaraõ (2016)	morango	hipoclorito de sódio e detergente	gelatina, extrato menta e cravo	-	9 ± 1	-	3	Não prolongou vida útil, maior perda de massa e aspecto visual ruim
Oregel- Zamudio et al., (2017)	morango	-	goma guar, cera de candelilla, <i>Bacillus subtilis</i> HFC103	-	25	-	6	Reduziu perda de massa, sem alteração de pH e SST, reduziu <i>R. stolonifer</i>

Guerreiro et al., (2015)	morango	-	alginato de sódio, pectina, ácido ascórbico,	Citral e Eugenol	0,5	-	14	Redução da deterioração microbiana, boa propriedade sensorial até o dia 7
Vu et al., (2011)	morango	-	quitosana	Limão, hortelã, orégano e tomilho	4		14	Cobertura com OE de limão foi o mais eficiente
Velickova et al., (2013)	morango	-	quitosana, cera de abelha	-	20	35% -45%	7	Coberturas de 3 camadas reduziram perda de massa e senescência, porém menor aceitabilidade que o de quitosana
Perdones et al., (2012)	morango	hipoclorito de sódio	quitosana	Limão	4 ± 1	90	10	Reduziu crescimento fúngico, não alterou características físico-químicas do morango
Guerra et al., (2015)	tomate cereja	hipoclorito de sódio	quitosana	<i>Mentha piperita</i> e <i>Mentha x villosa</i> Huds	25 °C – 12 °C	-	12 – 24	Reduziram o crescimento dos fungos nas 2 temp., preservaram vida útil do tomate cereja nos atributos físico-químicos e sensoriais

(-) dados não constam no trabalho. Fonte: Elaborado pelo autor.

2.2 Óleos Essenciais

Óleos essenciais ou óleos voláteis são substâncias oleosas aromáticas de sabores ácidos e picantes, geralmente incolores ou ligeiramente amareladas, obtidas a partir de folhas, flores, sementes, galhos e raízes de plantas (BURT, 2004; CALO et al., 2015). Os óleos essenciais consistem quimicamente de compostos de terpenos e compostos aromáticos (SOLÓRZANO-SANTOS e MIRANDA-NOVALES, 2012; TONGNUANCHAN, BENJAKUL e PRODPRAN, 2013). O método mais comum para extração desses óleos é por meio de destilação a vapor, mas existem outras técnicas em que podem ser obtidos como por prensagem a frio, maceração, fermentação e etc. (BURT, 2004; FALEIRO, 2011; SOLÓRZANO-SANTOS e MIRANDA-NOVALES, 2012).

Os óleos essenciais são utilizados como constituintes de perfumes, produtos farmacêuticos e na fabricação de diversos produtos alimentícios. Suas propriedades potenciais estão ligadas aos efeitos antimicrobianos, antivirais e antioxidantes. Os óleos essenciais são considerados potenciais alternativas aos aditivos sintéticos e são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA), por fazerem parte da dieta humana a muitos anos. Porém, seu uso como conservantes de alimentos é restrito devido aos efeitos sensoriais negativos quando introduzidos em quantidades suficientes para proporcionar ação antimicrobiana. Contudo, quando se incorpora óleos essenciais em películas, em vez de aplicar diretamente no produto, têm-se a vantagem de reduzir a taxa de difusão dos compostos ativos permitindo o efeito antimicrobiano desejado em concentrações de óleo menores, diminuindo sabores e odores indesejados aos alimentos (PERSICO et al., 2009; AHMAD et al., 2012; TONGNUANCHAN, BENJAKUL e PRODIPRAN, 2014; CALO et al., 2015).

Alguns autores relataram que a incorporação de óleos essenciais em filmes de gelatina aumentaram as propriedades de barreira ao vapor de água, a flexibilidade e proporcionam atividade antioxidante e antimicrobiana (PIRES et al., 2011; TONGNUANCHAN, BENJAKUL e PRODIPRAN, 2012; TONGNUANCHAN, BENJAKUL e PRODIPRAN, 2013). Arfat et al. (2014), estudaram as propriedades antimicrobiana de filmes de gelatina adicionados com óleo essencial de manjeriço e nanopartículas de óxido de zinco (ZnO), concluíram que os filmes possuíam forte atividade antibacteriana, podendo ser utilizados

como embalagens de alimentos para garantir a segurança de alimentos e prolongar vida útil dos produtos.

Existem óleos essenciais que são compatíveis com algumas características sensoriais de frutas e hortaliças. Diferentes autores comentaram que existe a possibilidade de prevenir o crescimento microbiano por meio destes materiais (BURT, 2004; SANCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011; MARTUCCI et al., 2015). Os principais responsáveis pelas propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais são os compostos fenólicos e alguns óleos apresentam mais de 60 compostos destes. A caracterização dos óleos essenciais pode ser realizada por cromatografia gasosa acoplada e espectrometria de massa (BURT, 2004; GALINDO et al., 2010).

2.2.1 Óleo Essencial de Menta

Mentha arvensis, espécie conhecida popularmente como hortelã selvagem ou menta, pertencente ao gênero *Mentha* da família Lamiaceae com mais de 25 espécies, que estão distribuídas naturalmente na Europa, Ásia, África e América do Norte. É uma erva comestível, de sabor e odor característicos, e a partir dela se produz o óleo essencial de menta, fonte rica em mentol (KUMAR et al., 2011; TIWARI, 2016).

O componente principal do OEM é o mentol, um monoterpene, o qual é o maior responsável pela atividade antimicrobiana. O rendimento do óleo depende de fatores ambientais, da cultura, época da colheita, métodos de destilação e condições de armazenamento. Sua utilização é bastante variada na indústria farmacêutica (xaropes, creme dental, enxaguantes bucais, perfumes, etc.), na culinária (sucos, chás, molhos, etc.) e na indústria de alimentos (balinhas, sorvetes, bebidas, geléias, etc.) (EDRIS e FARRAG, 2003; TIWARI, 2016).

As atividades antifúngicas e antibacterianas do OEM ou de seus principais compostos está relatada em diversas pesquisas encontradas na literatura. Os autores concluem que o OEM pode ser uma boa alternativa aos bactericidas químicos utilizados em alimentos e para diversos fins mercadológicos (ISCAN et al., 2002; SACCHETTI et al., 2005; SCHELZ, MOLNAR e HOHMANN, 2006; NASCIMENTO et al., 2009; KUMAR et al., 2011; GUPTA, SHARMA e NAIK, 2011; KAMATOU et al., 2013; ABBASZADEH et al., 2014; BISWAS, SAHA e ALI, 2014; GUERRA, et al., 2015; TIWARI, 2016).

Abbaszadeh et al. (2014) avaliaram a atividade antifúngica de diferentes compostos, entre eles o mentol, sobre o crescimento de

diferentes fungos. Os resultados apresentados por eles mostraram que o mentol era ativo contra todos os fungos testados (*Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* spp., *Rhizopus oryzae*, *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata*), e os valores da concentração mínima inibitória variaram de 100 a 450 µg/mL.

Combrinck, Regnier e Kamatou (2011) avaliaram a atividade *in vitro* de dezoito óleos essenciais e alguns componentes principais contra fungos patogênicos comuns de frutas na pós-colheita. O OEM (47 % teor de mentol) apresentou atividade para inibir 100 % do fungo *Botrytis cinerea* na concentração mais baixa de 3,0 µL/mL.

Guerra et. al. (2015) estudaram o comportamento de filmes de quitosana com óleo essencial de *Mentha piperita* ou *Mentha x villosa* Huds para prevenir infecções comuns na pós-colheita do tomate cereja. Eles avaliaram a concentração mínima inibitória dos dois óleos essenciais contra os fungos *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *Rhizopus stolonife* que foi de 5,0 µL/mL. O principal composto no óleo essencial de *Mentha piperita* L. era o mentol com 30,3 % e da *Mentha x villosa* Huds era a rotundifolona com 70,2 %.

2.2.2 Nanoemulsão de Óleos Essenciais

Emulsões são sistemas heterogêneos, termodinamicamente instáveis, que tendem a separação física natural. São compostas por três fases: aquosa, oleosa e emulsificante. Não são capazes de se formar espontaneamente (exceto microemulsões) e suas características dependem de como são preparadas e ordem de adição de seus componentes (HOLMBERG et al., 2002; DONSI e FERRARI, 2016). As emulsões podem ser denominadas como macroemulsões, nanoemulsões, microemulsões, soluções micelares e soluções moleculares, de acordo com seus tamanhos e estruturas (ANSEL, POPOVICH e ALLEN JR, 1999).

As nanoemulsões são emulsões compreendidas entre as macroemulsões e microemulsões. Com tamanhos de gotículas entre 10 a 500 nm, elas podem apresentar transparência óptica quando os tamanhos de gotículas são em média menores que 10 nm, levemente opacas entre 40 a 100 nm e aparência leitosa quando acima de 100 nm (MCCLEMENTS, 2011; SALVIA-TRUJILLO et al., 2015a; ACEVEDO-FANI et al., 2015; DONSI e FERRARI, 2016; GUPTA et al., 2016). As nanoemulsões são estáveis por um longo período de tempo e requerem baixas concentrações de tensoativos, comparadas às

microemulsões. Elas são formadas usando alta energia de emulsificação com equipamentos de homogeneização de alta pressão, microfluidizadores ou ultrassom, sendo uma técnica que permite extensa escolha dos constituintes da formulação e melhor controle do tamanho de gotas. O método de formação de nanoemulsões usando baixa energia de emulsificação faz-se uso de propriedades físico-químicas do sistema e utilizam a inversão espontânea na curvatura do tensoativo para a obtenção de nanogotas (SOLÉ et al., 2010; DONSI e FERRARI, 2016).

O uso de nanoemulsões de óleos essenciais está cada vez mais sendo investigado em diversas áreas farmacêuticas (entrega de drogas e produtos de perfumaria) e de alimentos (proteger alimentos líquidos ou frutas e hortaliças minimamente processadas) (DONSI et al., 2014; DONSI e FERRARI, 2016). Como a incorporação direta dos óleos essenciais encontra limitações relacionadas com a hidrofobicidade, instabilidade volátil, atividade biológica e sabor forte, a tecnologia de nanoemulsão é capaz de proporcionar melhoras na estabilidade da emulsão e atividade biológica, pelo aumento da área de superfície e minimização das propriedades sensoriais podendo ser utilizadas menores quantidades de óleo no produto (MCCLEMENTES e RAO, 2011; ACEVEDO-FANI et al., 2015; SALVIA-TRUJILLO et al., 2015a; SALVIA-TRUJILLO et al., 2015b; DONSI e FERRARI, 2016).

É possível avaliar a qualidade de nanoemulsões, quanto à sua estabilidade, por diferentes métodos. A análise dos tamanhos de gotas da fase interna da emulsão determina se ocorre coalescência ou floculação, quanto menor o tamanho dos glóbulos, mais estável é a nanoemulsão. O potencial zeta indica as propriedades da interface e da solução contínua (próxima à interface), estando relacionado à repulsão eletrostática entre gotas dispersas próximas. Quando o valor do potencial zeta em módulo é elevado (> 30 mV) indica estabilidade físico-química da emulsão, uma vez que forças repulsivas tendem a evitar possível floculação. Variações nos valores de pH podem indicar existência de reações químicas que podem modificar a qualidade da estabilidade da nanoemulsões (MORAIS et al., 2006).

Em estudos realizados por Salvia-Trujillo et al. (2015b), utilizando nanoemulsões de óleos essenciais adicionados em revestimento comestível para aplicação em maçãs, eles concluíram que as técnicas empregadas contribuíram para melhorar a segurança e qualidade dos frutos frescos. Salvia-Trujillo et al. (2015a) caracterizaram emulsões e nanoemulsões de óleos essenciais e obtiveram respostas promissoras da

utilização de nanoemulsões como sistemas de entrega de agentes aromatizantes e conservantes na indústria de alimentos.

Alexandre et al. (2016) produziram filmes à base de gelatina, adicionados de montmorilonita e nanoemulsões de óleo essencial de gengibre, e concluíram que a incorporação dos agentes nos filmes de gelatina aumentou a espessura, diminuiu a solubilidade e permeabilidade ao vapor de água, aumentou a flexibilidade dos filmes, e os filmes obidos apresentaram atividade antioxidante. Porém, não apresentaram atividade antimicrobiana para as bactérias testadas.

Acevedo-Fani et al. (2015) estudaram filmes comestíveis de nanoemulsões de óleo essencial de tomilho, limão e sálvia como fase dispersa e alginato como fase contínua. Os potenciais zeta das nanoemulsões variaram conforme o óleo essencial utilizado. Os filmes com óleo essencial de tomilho apresentaram maior atividade antimicrobiana. Equanto, os filmes com óleo essencial de sálvia apresentaram maior transparência, resistência ao vapor de água e propriedades mecânicas comparado aos filmes contendo óleo essencial de limão e tomilho.

2.3 Coberturas Comestíveis

As películas comestíveis podem ser classificadas como filmes, que são pré-formados em um suporte e depois são aplicados sobre o produto, e como coberturas, que são formadas sobre a superfície do alimento, podendo ser por imersão, aspersão, fluidização ou aplicação com um pincel (CUQ et al., 1995).

Os materiais poliméricos biodegradáveis naturais mais comuns e de baixo custo para a formação de películas comestíveis são os polissacarídeos (amido, celulose, quitosana, alginato, pectinas, gomas), as proteínas (gelatina, caseína, zeína) e os triglicerídeos (óleos vegetais, cera de abelha), que são capazes de formar uma rede tridimensional semi-rígida que retém o solvente (água, ácidos, entre outros) (GONTARD et al., 1993; CORTEZ-VEGA et al., 2013).

Algumas películas comestíveis elaboradas com esses materiais requerem plastificantes (glicerol, sorbitol) e emulsificantes (ácidos graxos, lecitina, polisorbatos). Os plastificantes, agentes de baixa massa molecular, quando incorporados às formulações das películas, modificam as interações intermoleculares, aumentando a mobilidade das cadeias poliméricas e reduzindo a temperatura de transição vítrea do sistema, proporcionando, assim, maior flexibilidade ao material (CHIUMARELLI

e HUBINGER, 2014). O aumento na incorporação de plastificantes, em geral, faz com que ocorra diminuição da força e aumento da deformação na ruptura das películas, mas causam aumento da permeabilidade aos gases e ao vapor de água, já que possuem características hidrofílicas e higroscópicas (GONTARD et al., 1993; CUQ et al., 1995). Os emulsificantes, agentes tensoativos anfílicos, interagem na interface lipídio-água e diminuem a tensão interfacial entre as fases dispersa e contínua, melhorando a estabilidade da emulsão (HAN e GENNADIOS, 2005; RODRÍGUEZ et al., 2006).

As coberturas comestíveis desempenham papel importante na distribuição, conservação e comercialização dos alimentos, possuindo funções contra choques mecânicos, danos químicos e microbiológicos. Elas promovem barreiras semipermeáveis, inibindo a migração de umidade, oxigênio, dióxido de carbono, aromas, entre outros (FALGUERA et al., 2011). Elas podem melhorar a aparência dos alimentos e incorporar agentes anti-escurecimento, saborizantes, corantes, nutrientes e agentes antimicrobianos (SALVA-TRUJILLO et al., 2015b). Além disso, as coberturas comestíveis devem apresentar-se seguras para a saúde, apresentar estabilidade microbiológica, não conter compostos tóxicos e possuírem características sensoriais aceitáveis (DIAB et al., 2001).

A eficácia de cada película comestível depende de suas propriedades mecânicas, de barreira, físico-químicas e microbiológicas, as quais estão ligadas ao arranjo molecular dos diferentes componentes das coberturas. Essas propriedades podem ser afetadas pelo produto que será recoberto, como, por exemplo, a umidade da superfície do vegetal. Com isso, faz-se necessário a caracterização dessas películas comestíveis por meio de análises de espessura, cor, transparência, opacidade, permeabilidade ao vapor de água, solubilidade, umidade, permeabilidade aos gases, propriedades mecânicas, morfologia, avaliações sensoriais e microbiológicas (VARGAS et al., 2008; FAGUNDES et al., 2013).

A espessura das coberturas comestíveis é influenciada pela concentração de sólidos da solução formadora de filmes e é um parâmetro importante para as propriedades de permeabilidade ao vapor de água, mecânicas e transparência (AHMAD et al., 2012; FAKHOURI et al., 2015). Para Choi et al. (2016), a espessura média das coberturas de hidroxipropilmetilcelulose com óleos essenciais de orégano e bergamota foi de 32,4 μm . Eles explicaram que a presença de partículas do óleo no filme não afetou a variação da espessura. Perdones et al. (2012) observaram que as espessuras dos filmes de quitosana diminuíram

significativamente quando o óleo foi adicionado e atribuíram à perda de compostos voláteis durante a secagem do filme. Para Pires et al. (2013), as espessuras dos filmes de gelatina adicionados dos óleos essenciais de estragão e tomilho não apresentaram diferença significativa do filme controle, porém os filmes adicionados dos óleos de citronela e coentro diferiram significativamente do filme controle. Essa redução da espessura dos filmes foi associada a interações hidrofóbicas entre óleos e proteínas, devido aos altos níveis de hidrocarbonetos dos óleos.

Para Vargas et al. (2006), Ahmad et al. (2012), Thongnuanchan et al. (2012) e Thongnuanchan et al. (2013) a espessura dos filmes aumentaram de acordo com as concentrações dos óleos.

As propriedades ópticas das coberturas comestíveis são importantes quando se deseja manter as características originais dos produtos, como a cor e o brilho. A opacidade do material demonstra sua maior ou menor transparência, a qual é caracterizada pelo bloqueio da passagem de luz (Martucci et al., 2015). Alguns autores relataram alterações da opacidade e a redução da transparência de filmes adicionados de óleos essenciais e explicaram que esse comportamento ocorre devido a dispersão de luz na interface de gotículas de óleo essencial incorporados na matriz do filme e dependentes do tipo de óleo (THONGNUANCHAN et al., 2012; THONGNUANCHAN et al., 2013; PIRES et al., 2013; MARTUCCI et al., 2015).

As propriedades de barreira das coberturas comestíveis dependem do tipo de alimento que será coberto. Elas podem atuar como barreiras ao vapor de água (evitar perda de massa do fruto), aos gases (controle da taxa de respiração), solutos, óleos e aromas (manter odor característico). Geralmente, filmes proteicos apresentam alta barreira aos gases e baixa barreira ao vapor de água, sendo que a adição de compostos hidrofóbicos e a espessura do filme podem melhorar essas características (VARGAS, 2008). Segundo Perdonés et al. (2012), o efeito do óleo essencial de limão em coberturas de quitosana favoreceu a redução da permeabilidade ao vapor de água em comparação ao filme controle de 35×10^{11} g/Pa.s.m para $19,7 \times 10^{11}$ g/Pa.s.m. Anker et al. (2002) explicaram que as gotículas de vapor de água tem menor afinidade e maior dificuldade no percurso de difusão através da matriz pelo fato de existirem glóbulos lipídicos distribuídos.

Ahmad et al. (2012) verificaram que a permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina de pele de peixe com óleo essencial de limoneno foi menor em relação ao filme com óleo de bergamota. Isso

pode ocorrer devido à diferença na natureza hidrofóbica dos óleos essenciais utilizados (MARTUCCI et al., 2015).

Bertan et al. (2005) caracterizaram filmes de gelatina e triacetina adicionados de óleo resinoso altamente hidrofóbico e observaram que a permeabilidade ao oxigênio aumentou, atribuindo esse resultado à existência de microporos na matriz do filme.

A natureza do material, coesão da matriz polimérica, processo de obtenção e eliminação do solvente podem influenciar diretamente as propriedades mecânicas das coberturas comestíveis (CHAMBI e GROSSO, 2006). A adição de compostos hidrofóbicos pode modificar a estrutura da matriz e diminuir a resistência à tração de filmes proteicos, sendo que essa está relacionada com a distribuição e interações intermoleculares e intramoleculares da rede do filme (PRODPRAN, BENJAKUL e ARTHARN, 2007; LIMPISOPHON, TANAKA e OSAKO, 2010; TONGNUANCHAN, BENJAKUL e PRODPRAN, 2012; MARTUCCI et al., 2015).

Para avaliar a estrutura e distribuição dos componentes na matriz filmogênica com fins qualitativos, podem ser utilizadas técnicas de microscopia. Tongnuanchan, Benjakul e Prodpran (2012) observaram a boa distribuição de óleos essenciais na matriz de filmes de gelatina por meio de micrografias de filmes lisos e homogêneos e fizeram uma relação com a redução da permeabilidade ao vapor de água. Quando há colapso da emulsão durante a secagem de filmes proteicos incorporados de óleos, pode-se observar manchas escuras, rachaduras ou bolhas, o que indica que a dispersão na película não é estável, gerando filmes mais heterogêneos (TONGNUANCHAN et al., 2012).

As técnicas térmicas são utilizadas para avaliar as interações entre os componentes na matriz dos filmes. Por calorimetria diferencial de varredura têm-se as medidas de temperatura e do fluxo de calor associados às transições dos materiais pelo tempo e temperatura (MOTHÉ e AZEVEDO, 2002; SOBRAL, 2000). Bertan et al. (2005) explicaram que os termogramas de filmes de gelatina com ácidos palmítico ou esteárico apresentaram mais de um pico de fusão, propondo que a incorporação das substâncias hidrofóbicas não foi homogênea na matriz de gelatina. É possível relacionar valores de T_g com o deslocamento de moléculas do filme na fase amorfa e essa mudança influencia as propriedades do material, podendo ser explicados o comportamento físico e químico do sistema (NAGARAJAN et al., 2014; TONGNUANCHAN et al., 2016).

2.4 Gelatina

A gelatina é um material produzido a partir da hidrólise controlada do colágeno extraído de ossos, tendões, peles e tecidos conjuntivos gerados como resíduos durante o abate e processamento de animais (COZMUTA et al, 2015; HAZIRAH, ISA e SARBON, 2016). A gelatina é o derivado de proteína preferido como material para formação de películas comestíveis devido ao seu baixo custo, abundância natural, boa formação de película, ausência de odor e sabor e por ser de alta biodegradabilidade. Porém, a gelatina possui desvantagens por ser altamente sensível à água, formar filmes frágeis de baixa estabilidade térmica, podendo restringir sua utilização como embalagem de alimentos (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011; WENG e ZHENG, 2015).

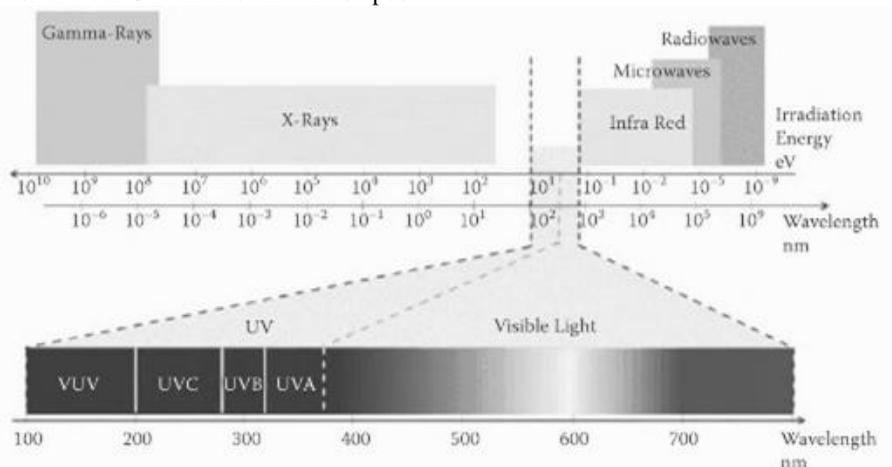
As coberturas comestíveis elaboradas à base de gelatina possuem propriedades que podem ser melhoradas a partir da incorporação de diferentes materiais em suas formulações. Os plastificantes são adicionados com o intuito de reduzir as interações intermoleculares das redes tridimensionais das cadeias de gelatina, promovendo maior flexibilidade à película formada. Os surfactantes são utilizados, quando necessário, para melhorar a estabilidade das partículas de lipídeos na matriz proteica. Os lipídeos possuem capacidade de diminuir a permeabilidade ao vapor de água devido à sua hidrofobicidade, melhorar a permeabilidade aos gases e até servirem como agentes antimicrobianos (KESTER e FENNEMA, 1986; COZMUTA et al, 2015).

As películas comestíveis biodegradáveis, produzidas a partir de proteínas de diferentes fontes, têm sido utilizadas com sucesso, devido à sua abundância e excelentes propriedades de barreira aos gases (PARK e CHINNAN, 1995; PRODPRAN, BENJAKUL e ARTHARN, 2007; AHMAD et al., 2012; ARFAT et al., 2014; TONGNUANCHAN et al. 2015; TONGNUANCHAN et al. 2016). Devido às vantagens e limitações de cada categoria de componentes para elaboração de coberturas comestíveis, muitos trabalhos propõem a combinação de diferentes materiais biológicos (proteínas, polissacarídeos, lipídeos) com agentes antimicrobianos naturais (óleos essenciais vegetais), extratos vegetais, fibras diversas, nanopartículas e microcápsulas, para melhorar as propriedades das coberturas (CHEN e NUSSINOVITCH, 2001; TONGNUANCHAN, BENJAKUL e PRODPRAN, 2013; TONGNUANCHAN et al. 2015; WU et al., 2015; ARFAT et al., 2017).

2.5 UV-C

A luz é considerada uma parcela do espectro de várias ondas eletromagnéticas que percorrem através do espaço (Figura 2.5). A radiação ultravioleta (UV) tem comprimento de onda que varia de 100 a 400 nm, a qual pode ser subdividida em UV-A de 315 a 400 nm, UV-B de 280 a 315 nm, UV-C de 200 a 280 nm e UV de vácuo de 100 a 200 nm (KOUTCHMA et al., 2009).

Figura 2.1 - Espectro de radiação eletromagnética com divisão do espectro de luz visível e luz UV em três diferentes tipos.



Fonte: KOUTCHMA et al., 2009.

A radiação eletromagnética ultravioleta de onda curta (UV-C) possui ação germicida, o qual tem como principal alvo o material genético de bactérias, fungos e vírus. O uso da UV-C para aplicação em alimentos é relativamente recente e de grande interesse por se tratar de uma tecnologia de baixo custo, de fácil manuseio, não tóxica, não deixa resíduos químicos nos alimentos e o principal, é eficaz no controle da deterioração e melhora na qualidade dos alimentos, prolongando o tempo de vida útil (LEMOINE et al., 2007; SHIN, SONG e SONG, 2012; LACIVITA et al., 2016; FORMICA-OLIMEIRA et al., 2017).

Shin, Song e Song (2012) estudaram o efeito de tratamentos com dióxido de cloro aquoso, aplicação de UV-C e embalagem de filme proteico de farelo de arroz com extrato de semente de toranja na vida útil de morangos. Os resultados mostraram que o efeito do dióxido de cloro

aquoso com UV-C e com o filme reduziram a população de bactérias quando comparado com os tratamentos estudados individualmente. Para os atributos cor, acidez e análise sensorial o tratamento combinado foi o que apresentou melhores resultados até os 11 dias de armazenamento comparado com os tratamentos individualizados. Xu et al. (2016) também concluíram que a combinação de 2 mg/L de dióxido de cloro aquoso com aplicação de 4 kJ/m² de UV-C em frutos de mirtilo foi mais eficaz do que os tratamentos estudados individualmente.

A aplicação de UV-C pode, em alguns casos, diminuir a produção de etileno como em estudos realizados por Stevens et al. (1998), os quais aplicaram a técnica de UV-C em frutos de pêssegos, causando diminuição no amadurecimento. Já em outro caso relatado por Tiecher et al. (2013), a produção de etileno em tomates aumentou com a aplicação de UV-C, e neste caso também ocorreu redução da maturação dos frutos.

Severino et al. (2014) em estudos recentes obtiveram resultados potenciais na redução de *Listeria monocytogenes* em brócolis com uso de revestimentos de quitosana e óleos essenciais com tratamentos não térmicos, como UV-C, água ozonizada e irradiação gama.

Graça et al. (2013) estudaram a aplicação de UV-C em fatias de maçã e avaliaram as amostras por um período de 15 dias. Concluíram, que o tratamento com UV-C pode ser uma alternativa à lavagem com solução de hipoclorito. Os autores também constataram que o tratamento com UV-C não afetou as propriedades de qualidade da maçã.

Por meio de uma breve revisão sobre os efeitos fisiológicos da luz UV-C e seu potencial na agronomia realizada por Urban et al. (2016), esses autores fazem observações de que essa tecnologia é uma poderosa ferramenta para prolongar a vida útil de frutas e hortaliças frescas, assim como a síntese e acumulação de fitoquímicos promotores da saúde da planta na pré colheita e pós colheita e que os próximos estudos utilizando a luz UV-C virão reforçar ainda mais essas ideias.

2.6 Referências Bibliográficas

ABBASZADEH, S., SHARIFZADEH, A., SHOKRI, H., KHOSRAVI, A. R., ABBASZADEH, A. **Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi.** Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology, v. 24, p. 51–56, 2014.

ACEVEDO-FANI, A., SALVIA-TRUJILLO, L., ROJAS-GRAÜ, M. A., MARTÍN-BELLOSO, O. **Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties.** *Food Hydrocolloids*, v. 47, p. 168 - 177, 2015.

ADAY, M. S., CANER, C. **The shelf life extension of fresh strawberries using an oxygen absorber in the biobased package.** *LWT - Food Science and Technology*, v. 52, p. 102–109, 2013.

ADAY, M. S., TEMIZKAN, R., BÜYÜKCAN, M. B., CANER, C. **An innovative technique for extending shelf life of strawberry: Ultrasound.** *LWT - Food Science and Technology*, v. 52, p. 93–101, 2013.

AHMAD, M.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; AGUSTINI, T. W. **Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils.** *Food Hydrocolloids*, v. 28, p. 189-199, 2012.

ALEXANDRE, E. M. C., LOURENÇO, R. V., BITTANTE, A. M. Q. B., MORAES, I. C. F., SOBRAL, P. J. A. **Gelatin-based films reinforced with montmorillonite and activated with nanoemulsion of ginger essential oil for food packaging applications.** *Food Packaging and Shelf Life*, v. 10, p. 87–96, 2016.

AN, D. S., PARK, E., LEE, D. S. **Effect of hypobaric packaging on respiration and quality of strawberry and curled lettuce.** *Postharvest Biology and Technology*, v. 52, p. 78–83, 2009.

ANKER, M.; STANDING, M.; HERMANSSON, A. M. **Relationship between the Microstructure and the Mechanical and Barrier Properties of Whey Protein Films.** *Journal of Agricultural Food Chemical*, v. 48, p. 3806-3816, 2002.

ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G., ALLEN JR, L. V. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.** 6 ed. São Paulo: Premier, 1999.

ARFAT, Y., BENJAKUL, S., PRODPRAN, T., OSAKO, K. **Desenvolvimento e caracterização de filmes de combinação com base na proteína isolada de peixe e gelatina de pele de peixe.** Food hidrocolóides, v. 39, p. 58-67, 2014.

ARFAT, Y. A., AHMED, J., HIREMATH, N., AURAS, R., JOSEPH, A. **Thermo-mechanical, rheological, structural and antimicrobial properties of bionanocomposite films based on fish skin gelatin and silver-copper nanoparticles.** Food Hydrocolloids, v. 62, p. 191–202, 2017.

BERTAN, L. C.; TANADA-PALMU, P. S.; SIANI, A. C.; GROSSO, C. R. F. **Effect of fatty acids and “Brazilian elemi” on composite films based on gelatin.** *Food Hydrocolloids*, Tongxiang City, v.19, p.73-82, 2005.

BILL, M., SIVAKUMAR, D., KORSTEN, L., THOMPSON, A. K. **The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage.** Crop Protection, v. 64, p. 159 - 167, 2014.

BISWAS, N. N., SAHA, S., ALI, M. K. **Antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and analgesic activities of ethanolic extract of *Mentha arvensis* L.** Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 4, p. 792–797, 2014.

BORGES, C. D., MENDONÇA, C. R. B., ZAMBIAZI, R. C., NOGUEIRA, D., PINTO, E. M., PAIVA, F. F. **Strawberries conservation with coatings based on xanthan gum and sage essential oil.** Bioscience Journal, v. 29, p. 1071-1083, 2013.

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

CALO, J. R., CRANDALL, P. G., O'BRYAN, C. A., RICKE, S. C. **Essential oils as antimicrobials in food systems e A review.** Food Control, v. 54, p.111 - 119, 2015.

CASTELLO M. L., FITO, P. J., CHIRALT, A. **Changes in respiration rate and physical properties of strawberries due to osmotic dehydration and storage.** Journal of Food Engineering, v. 97, p. 64–71, 2010.

CHAMBI, H.; GROSSO, C. **Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase.** Food Research International, v. 39, n. 4, p. 458-466, 2006.

CHEN, S.; NUSSINOVITCH, A. **Permeability and roughness determinations of wax-hydrocolloid coatings, and their limitations in determining citrus overall quality.** Food Hydrocolloids, v. 15, n. 2, p. 127–37, 2001.

CHIRALT, A., MARTINEZ-NAVARRETE, N., MARTINEZ-MONZO, J., TALENS, P., MORAGA, G., AYALA, A., FITO, P. **Changes in mechanical properties throughout osmotic processes: cryoprotectant effect.** Journal of Food Engineering, v. 49, p. 129-135, 2001.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio.** 2 ed., p. 783, Lavras: FAEPE, 2005.

CHIUMARELLI, M., HUBINGER, M. **Evaluation of edible films and coatings formulated with cassava starch, glycerol, carnauba wax and stearic acid.** Food Hydrocolloids, v. 38, p. 20-27, 2014.

CHOI, W. S., SINGH, S., LEE, Y. S. **Characterization of edible film containing essential oils in hydroxypropyl methylcellulose and its effect on quality attributes of 'Formosa' plum (*Prunus salicina* L.).** LWT - Food Science and Technology, v. 70, p. 213 - 222, 2016.

CONBRINCK, S., REGNIER, T., KAMATOU, G. P. P. ***In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against**

common postharvest fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops and Products*, v. 33, p. 344–349, 2011.

CORTEZ-VEGA, W. R.; BAGATINI, D. C.; SOUZA, J. T. A.; PRENTICE, C. **Biofilmes nanocompósitos obtidos de isolado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*) e Montmorilonita: Avaliação das propriedades físicas, mecânicas e de barreira.** *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 16, p. 90-98, 2013.

COZMUTA, A. M.; TURILA, A.; APJOK, R.; CIOCIAN, A.; COZMUTA, L. M.; PETER, A.; NICULA, C.; GALIC, N.; BENKOVIC, T. **Preparation and characterization of improved gelatin films incorporating hemp and sage oils.** *Food Hydrocolloids*, v. 49, p. 144-155, 2015.

CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. **Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties.** *Journal of Food Science*, v. 60, p. 1369-1374, 1995.

DIAB, T.; BILIADERIS, C. G.; GERASOPOULOS, D.; SFAKIOTAKIS, E. **Physicochemical properties and application of pullulan edibles films and coatings in fruit preservation.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 81, p. 988-1000, 2001.

DONSÌ, F., CUOMO, A., MARCHESE, E., FERRARI, G. **Infusion of essential oils for food stabilization: unraveling the role of nanoemulsion-based delivery systems on mass transfer and antimicrobial activity.** *Innovative Food Science e Emerging Technologies*, v. 22, p. 212–220, 2014.

DONSÌ, F., FERRARI G. **Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food.** *Journal of Biotechnology*, v. 233, p. 106–120, 2016.

DUAN, J., WU, R., STRIK, B. C., ZHAO, Y. **Effect of edible coatings on the quality of fresh blueberries (Duke and Elliott) under commercial storage conditions.** *Postharvest Biology and Technology*, v. 59, p. 71–79, 2011.

EDRIS, A. E., FARRAG, E. S. **Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase.** *Nahrung*, v. 47, p. 117-121, 2003.

EL-MOGY, M. M., ALSANIUS, B. W. **Cassia oil for controlling plant and human pathogens on fresh strawberries.** *Food Control*, v. 28, p. 157–162, 2012.

FAGUNDES, C., PÉREZ-GAGO, M. B., MONTEIRO, A. R., PALOU, L. **Antifungal activity of food additives in vitro and as ingredients of hydroxypropyl methylcellulose-lipid edible coatings against *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 166, p. 391-398, 2013.

FAKHOURI, F. M., MARTELLI, S. M., CAON, T., VELASCO, J. I., MEI, L. H. I. **Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes.** *Postharvest Biology and Technology*, v. 109, p. 57–64, 2015.

FALEIRO, M. L. **The mode of antibacterial action of essential oils.** *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, v. 2, p. 1143–1156, 2011.

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

FAN, Y., XU, Y., WANG, D. F., ZHANG, L., SUN, SUN, L. P., ZHANG, B. **Effect of alginate coating combined with yeast antagonist on strawberry (*Fragaria × ananassa*) preservation quality.** *Postharvest Biology and Technology*, v. 53, p. 84-90, 2009.

FAMIANI, F., CULTRERA, N. G., BATTISTELLI, A., CASULLI, V., PROIETTI, P., STANDARDI, A., CHEN, Z. H., LEEGOOD, R. C.,

WALKER, R. P. **Phosphoenolpyruvate carboxykinase and its potential role in the catabolism of organic acids in the flesh of soft fruit during ripening.** Journal of Experimental Botany, v. 56, p. 2959–2969, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. FAOSTAT: **Agricultural Production/strawberry.** (2014). Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acessado em: 15 de novembro de 2016.

FORMICA-OLIVEIRA, A. C., MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, G. B., DÍAZ-LÓPEZ, V., ARTÉS, F., ARTÉS-HERNÁNDEZ, F. **Effects of UV-B and UV-C combination on phenolic compounds biosynthesis in fresh-cut carrots.** Postharvest Biology and Technology, v. 127, p. 99–104, 2017.

GALINDO, L. A.; PULTRINI, A. M.; COSTA, M. **Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil.** Journal of Natural Medicines, v. 64, n. 4, p. 436-41, 2010.

GARCIA, L. C., PEREIRA, L. M., SARANTOPOULOS, C. I. G. D. L., HUBINGER, M. D. **Selection of edible starch coating for minimally processed strawberry.** Food and Bioprocess Technology, v. 3, p. 834–842, 2010.

GHAOUTH, A. E., ARUL, J., PONNAMPALAM, R., BOULET, M. **Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries.** Journal of Food Science, v. 56, p. 1618–1620, 1991.

GOL, N. B., PATEL, P. R., RAO, T. V. R.. **Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan.** Postharvest Biology and Technology, v. 85, p. 185–195, 2013.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C., GIMÉNEZ, B., LÓPEZ-CABALLERO, M.E., MONTERO, M.P. **Functional and bioactive properties of**

collagen and gelatin from alternative sources: a review. Food Hydrocolloids, v. 25, p. 1813-1827, 2011.

GONTARD, N., GUILBERT, S. e CUQ, J. L. **Water and glycerol as plasticizer affect mechanical and water barrier properties of an edible wheat gluten film.** Journal of Food Science, v. 58, p. 206-211, 1993.

GRAÇA, A., SALAZAR, M., QUINTAS, C., NUNES, C. **Low dose UV-C illumination as an eco-innovative disinfection system on minimally processed apples.** Postharvest Biology and Technology, v. 85, p. 1–7, 2013.

GUERRA, I. C. D., OLIVEIRA, P. D. DE, PONTES, A. L. S., LÚCIO, A. S. S. C., TAVARES, J. F., BARBOSA-FILHO, J. M., MADRUGA, M. S., E. L. DE. **Coatings comprising chitosan and Mentha piperita L. or Mentha × villosa Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit.** International Journal of Food Microbiology, v. 214, p. 168–178, 2015.

GUERREIRO, A. C., GAGO, C. M. L., FALEIRO, M. L., MIGUEL, M. G. C., ANTUNES, M. D. C. **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, 2015.

GUPTA, A., SHARMA, S., NAIK, S. N. **Biopesticidal value of selected essential oils against pathogenic fungus, termites, and nematodes.** International Biodeterioration & Biodegradation, v. 65, p. 703–707, 2011.

GUPTA, A., ERAL, H. B., HATTON T. H., DOYLE, P. S. **Nanoemulsions: formation, properties and applications.** Royal Society of Chemistry, v. 12, p. 2826 - 2841, 2016.

HAN, C., ZHAO, Y., LEONARD, S. W., TRABER, M. G. **Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh**

and frozen strawberries (*Fragaria* × *ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). Postharvest Biology and Technology, v. 33, p. 67–78, 2004.

HAN, J. H.; GENNADIOS, A. **Edible Films and Coatings: A Review.** Innovations in Food Packaging, a volume in Food Science and Technology, p. 239-262, 2005.

HANCOCK, J. F., SJULIN, T. M., LOBOS, G. A. **Temperate Fruit Crop Breeding**, Ed. Springer, p. 393-437, 2008.

HARKER, F. R., REDGWELL, R. J., HALLETT, I. C., MURRAY, S. H., CARTER, G. **Physical and mechanical changes in strawberry fruit after high carbon dioxide treatments.** Postharvest Biology and Technology, v. 19, p. 139–146, 2000.

HAZIRAH, M.A.S.P.; ISA, M.I.N.; SARBON, N.M. **Effect of xanthan gum on the physical and mechanical properties of gelatin-carboxymethyl cellulose film blens.** Food Packaging and Shelf Life, v. 9, p. 55-63, 2016.

HENRIQUE, C.M.; CEREDA, M.P. **Utilização de biofilmes na conservação pós-colheita de morango (*Fragaria Ananassa* Duch) cv IAC Campinas.** Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.19, n.2, p. 231-233, 1999.

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P., ALMENAR, E., VALLE, V., DEL VELEZ, D., GAVARA, R. **Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) quality during refrigerated storage.** Food Chemistry, v. 110, p. 428–435, 2008.

HOLMBERG, K., JÖNSSON, B., KRONBERG, B., LINDMAM, B. **Surfactants and polymers in aqueous solution**, 2 ed. New York: Jonh Wiley & Sons Ltd. p. 451-71, 2002.

ISCAN, G., KIRIMER, N., KURKCUOGLU, M., BASER, K. H., DEMIRCI, F. **Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential**

oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, p. 3943–3946, 2002.

KALT, W.; PRANGE, R. K.; LIDSTER, P. D. “**Postharvest color development of strawberries: Influence of maturity, temperature and light**”, *Canadian Journal of Plant Science*, v. 73, p. 541-548, 1993.

KAMATOU, G. P. P., VERMAAK, I., VILJOEN, A. M., LAWRENCE, B. M. **Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties.** *Phytochemistry*, v. 96, p. 15–25, 2013.

KESTER, J. J., FENNEMA, O. R. **Edible films and coatings: a review.** *Food Technology*, v. 40, p. 47-59, 1986.

KORTE, K. P., FAVARÃO, S. C. M. **Effect of gelatine colourless and commercial associated with plant extracts as edible coating in strawberry post-harves.** *Ciências Exatas e da Terra e Ciências Agrárias*, v. 11, p. 8-15, 2016.

KROCHTA, J.M. e MULDER-JOHNSTON C. **Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities.** *Food Technology*, v. 51, p. 61–74, 1997.

KRYSTIAN MARSZAŁEK, K., MARTA MITEK, M., SYLWIA SKAŃSKA, S. **The effect of thermal pasteurization and high pressure processing at cold and mild temperatures on the chemical composition, microbial and enzyme activity in strawberry purée.** *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 27, p.48-56, 2015.

KOUTCHMA, T. N., FORNEY, L. J., MORARU, C. I. **Ultraviolet Light in Food Technology: Principles and Applications.** CRC Press, Boca Raton, p. 33487-2742, 2009.

KOVAČEVIĆ, D. B., PUTNIK, P., DRAGOVIĆ-UZELAC, V., VAHČIĆ, N., BABOJELIĆ, M. S., LEVAJ, B. **Influences of organically and conventionally grown strawberry cultivars on**

anthocyanins content and color in purees and low-sugar jams. Food Chemistry, v. 181, p. 94-100, 2015.

KUMAR, P., MISHRA, S., MALIK, A., SATYA, S. **Insecticidal properties of Mentha species: a review.** Industrial Crops and Products, v. 34, p. 802–817, 2011.

LACIVITA, V., CONTE, A., MANZOCCO, L., PLAZZOTTA, S., ZAMBRINI, V. A., NOBILE, M. A. DEL., NICOLI, M. C. **Surface UV-C light treatments to prolong the shelf-life of Fiordilatte cheese.** Innovative Food Science & Emerging Technologies, v. 36, p. 150–155, 2016.

LEMOINE, M. L., CIVELLO, P. M., MARTINEZ, G. A., CHAVES, A. R. **Influence of postharvest UV-C treatment on refrigerated storage of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*).** Journal of the Science of Food and Agriculture. v. 87, p. 925-1175, 2007.

LIMPISOPHON, K., TANAKA, M., OSAKO, K. **Characterisation of gelatin–fatty acid emulsion films based on blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin.** Food Chemistry, v. 122, p. 1095–1101, 2010.

MANNING, K. **Biochemistry of Fruit Ripening: Soft fruits.** Chapman & Hall, London, UK, p. 347–373, 1993.

MARSZALEK, K., MITEK, M., SKĄPSKA, S. **The effect of thermal pasteurization and high pressure processing at cold and mild temperatures on the chemical composition, microbial and enzyme activity in strawberry purée.** Innovative Food Science and Emerging Technologies, v. 27, p. 48–56, 2015.

MARTUCCI, J.F.; GENDE, L.B.; NEIRA, L.M.; RUSECKAITE, R.A. **Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films.** Industrial Crops and Products, v. 71, p. 205-213, 2015.

MCCLEMENTS, D. J. **Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance.** *Soft Matter*, v. 7, n. 6, p. 2297, 2011.

MCCLEMENTS, D. J., RAO, J. **Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 51, p. 285–330, 2011.

MORAES, I. V. M.; CENCI, S. A.; BENEDETTI, B. C.; MAMEDE, A. M. G. N.; SOARES, A. G.; BARBOZA, H. T. G. **Physical and chemical characteristics of minimally processed strawberries stored under refrigeration and controlled atmospheres.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 274-281, 2008.

MORAIS, J. M., SANTOS, O. D. H., DELICATO, T., AZZINI, R., ROCHA-FILHO, P. A. **Physicochemical characterization of canola oil/water nanoemulsions obtained by determination of required HLB number and emulsion phase inversion methods.** *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 27, p.109-115, 2006.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise térmica de materiais.** Editora: São Paulo-SP, 300p., 2002.

NAGARAJAN, M., BENJAKUL, S., PRODPRAN, T., SONGTIPYA, P. **Characteristics of bio-nanocomposite films from tilapia skin gelatin incorporated with hydrophilic and hydrophobic nanoclays.** *Journal of Food Engineering*, v. 143, p. 195–204, 2014.

NASCIMENTO, E. M. M. DO, RODRIGUES, F. F. G., CAMPOS, A. R., COSTA, J. G. M. DA. **Phytochemical prospection, toxicity and antimicrobial activity of *Mentha arvensis* (Labiatae) from northeast of Brazil.** *Journal of Young Pharmacists*, v. 1, p. 210–212, 2009.

NUNES, M. C. N. BRECHT J. K., MORAIS A. M. M. B., SARGENT, S. A. **“Physical and chemical quality characteristics of strawberries after storage are reduced by a short delay to cooling”**, *Postharvest Biology and Technology*, v. 6, p. 17-28, 1995.

OREGEL-ZAMUDIO, E., ANGOA-PÉREZ, M. V., OYOQUE-SALCEDO, G., AGUILAR-GONZÁLEZ, C. N., MENA-VIOLANTE, H. G. **Effect of candelilla wax edible coatings combined with biocontrol bacteria on strawberry quality during the shelf-life.** *Scientia Horticulturae*, v. 214, p. 273–279, 2017.

PARK, H. J., CHINNAN, M. S. **Gás e vapor de água propriedades de barreira dos filmes comestíveis de proteína e materiais celulósicos.** *Journal of Food Engineering*, v. 25, p. 497-507, 1995.

PERDONES, A., SANCHEZ-GONZALEZ, L., CHIRALT, A., VARGAS, M. **Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of Strawberry.** *Postharvest Biology and Technology*, v.70, p. 32–41, 2012.

PERSICO, P., AMBROGI, V., CARFAGNA, C., CERRUTI, P., FERROCINO, I., MAURIELLO, G. **Nanocomposite polymer films containing carvacrol for antimicrobial active packaging.** *Polymer Engineering & Science*, v. 49, p. 1447 – 1455, 2009.

PIRES, C.; RAMOS, C.; TEIXEIRA, G.; BATISTA, R.; NUNES, L.; MARQUES, A. **Characterization of biodegradable films prepared with hake proteins and thyme oil.** *Journal of Food Engineering. J.*, v. 105, p. 422 – 428, 2011.

PIRES, C.; RAMOS, C.; TEIXEIRA, B.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; MARQUES, A. **Hake proteins edible films incorporated with essential oils: Physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties.** *Food Hydrocolloids Journal*, v. 30, p. 224 – 231, 2013.

PRODPRAN, T., BENJAKUL, S., ARTHARN, A. **Propriedades e microestrutura do filme baseado em proteínas de scad round (*Decapterus maruadsi*) muscular, afetado por óleo de palma e incorporação quitosana.** *Jornal Internacional de macromoléculas biológicas*, v. 41, p. 605-614, 2007.

RODRÍGUEZ, M., OSÉS, J., ZIANI, K., MATÉ, J. I. **Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films.** Food Research International, v. 39, p. 840-846, 2006.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M., BRUNI, R. **Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods.** Food Chemistry. J., v. 91, p. 621-632, 2005.

SALVIA-TRUJILLO, L., ROJAS-GRAÜ, M. A., SOLIVA-FORTUNY, R., MARTÍN-BELLOSO, O. **Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils.** Food Hydrocolloids, v. 43, p. 547-556, 2015a.

SALVIA-TRUJILLO, L., ROJAS-GRAU, M. A., SOLIVA-FORTUNY, R., MARTIN-BELLOSO, O. **Use of antimicrobial nanoemulsions as edible coatings: impact on safety and quality attributes of fresh-cut fuji apples.** Postharvest Biol. Technol. 105, 8-16, 2015b.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L., PASTOR, P., VARGAS, M., CHIRALT, A., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C., CHÁFER, M. **Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes.** Postharvest Biology and Technology, v. 60, p. 57-63, 2011.

SCHELZ, Z., MOLNAR, J., HOHMANN, J. **Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils.** Fitoterapia, v. 77, p. 279-285, 2006.

SEVERINO, R., VU, K.D., DONSI, F., SALMIERI, S., FERRARI, G., LACROIX, M. **Antibacterial and physical effects of modified chitosan based-coating containing nanoemulsion of mandarin essential oil and three non-thermal treatments against *Listeria innocua* in green beans.** International Journal of Food Microbiology, 191, 82-88, 2014.

SHAHBAZI, Y. **Application of carboxymethyl cellulose and chitosan coatings containing *Mentha spicata* essential oil in fresh strawberries.** International Journal of Biological Macromolecules. v. 112, p. 264–272, 2018.

SHIN, Y., SONG, H., SONG, K. B. **Effect of a combined treatment of rice bran protein film packaging with aqueous chlorine dioxide washing and ultraviolet-C irradiation on the postharvest quality of ‘Goha’ strawberries.** Journal of Food Engineering, v. 113, p. 374–379, 2012.

SHINA, Y., RYU, J., LIU, R. H., NOCK, J. F., WATKINS, C. B. **Harvest maturity, storage temperature and relative humidity effect fruit quality, antioxidant contents and activity, and inhibition of cell proliferation of strawberry fruit.** Postharvest Biology and Technology, v. 49, p. 201-209, 2008.

SILVA, F. L., ESCRIBANO-BAILÓN, M. T., ALONSO, J. J. P., RIVAS-GONZALO, J. C., SANTOS-BUELGA, C. **Anthocyanins pigments in strawberry.** LWT - Food Science and Technology, v. 40, p. 374-382, 2007.

SOBRAL, P. J. A.; OCUNO, D. **Permeabilidade ao Vapor de Água de Biofilmes a Base de Proteínas Miofibrilares de Carne.** Brazilian Journal of Food Technology, v. 3, p. 11-16, 2000.

SOLÉ, I., PEY, C. M., MAESTRO, A., GONZALEZ, C., PORRAS, M., SOLANS, C., GUTIERREZ, J. M. **Nano-emulsions prepared by the phase inversion composition method: preparation variables and scale up.** Journal Colloid Interface Science, v.344, p.417–423, 2010.

SOLÓRZANO-SANTOS, F., MIRANDA-NOVALES, M. G. **Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents.** Current Opinion in Biotechnology, v. 23, p. 136–141, 2012.

STEVENS, C., KHAN, V. A., LU, J. Y., WILSON, C. L., PULSEY, P. L., KABWE, M. K., IGWEGBE, E. C. K., CHALUTZ E., DROBY, S.

The germicidal and hermetic effects of UV-C light on reducing brown rot disease and yeast microflora of peaches. *Crop Protection*, v. 17, p. 75 - 84, 1998.

TANADA-PALMU, P. S., GROSSO, C. R. F. **Effect of edible wheat gluten-based films and coatings on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality.** *Postharvest Biology and Technology*, v. 36, p. 199–208, 2005.

TIECHER, A., PAULA, L. A., CHAVES, F. C., ROMBALDI, C. V. **UV-C effect on ethylene, polyamines and the regulation of tomatofruit ripening.** *Postharvest Biology and Technology*, v. 86, p. 230 – 239, 2013.

TIWARI, P. **Recent advances and challenges in trichome research and essential oil biosynthesis in *Mentha arvensis* L.** *Industrial Crops and Products*, v. 82, p. 141–148, 2016.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODIPRAN, T. **Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils.** *Food Chemistry*, v. 134, p.1571–1579, 2012.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODIPRAN, T. **Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils.** *Journal of Food Engineering*, v. 117, p. 350 – 360, 2013.

TONGNUANCHAN, P., BENJAKUL, S., PRODIPRAN, T. **Structural, morphological and thermal behaviour characterisations of fish gelatin film incorporated with basil and citronella essential oils as affected by surfactants.** *Food Hydrocolloids*, v. 41, p. 33-43, 2014.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODIPRAN, T.; NILSUWAN, K. **Emulsion film based on fish skin gelatin and palm oil: Physical, structural and thermal properties.** *Food Hydrocolloids*, v. 48, p. 248 – 259, 2015.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODIPRAN, T.; PISUCHPEN, S.; OSAKO, K. **Mechanical, thermal and heat sealing properties of fish skin gelatin film containing palm oil and basil essential oil with different surfactants.** *Food Hydrocolloids*, v. 56, p. 93 – 107, 2016.

URBAN, L., CHARLES, F., MIRANDA, M. R. A., AARROUF, J. **Understanding the physiological effects of UV-C light and exploiting its agronomic potential before and after harvest.** *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 105, p. 1 – 11, 2016.

VALENZUELA, C., TAPIA, C., LÓPEZ, L., BUNGER, A., ESCALONA, V., ABUGOCH, L. **Effect of edible quinoa protein-chitosan based films on refrigerated strawberry (*Fragaria × ananassa*) quality.** *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 18, p. 406 – 411, 2015.

VARGAS, M., ALBORS, A., CHIRALT, A., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. **Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan–oleic acid edible coatings.** *Postharvest Biology and Technology*, v. 41, p. 164–171, 2006.

VARGAS, M., PASTOR, C., CHIRALT, A., MCCLEMENTS, D. J., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. **Recent Advances in Edible Coatings for Fresh and Minimally Processed Fruits.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 48, p. 496-511, 2008.

VELICKOVA, E., WINKELHAUSEN, E., KUZMANOVA, S., ALVES, V. D., MOLDÃO-MARTINS, M. **Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa cv Camarosa*) under commercial storage conditions.** *LWT - Food Science and Technology*, v. 52, p. 80-92, 2013.

VENTURA-AGUILAR, R.I.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; FLORES-GARCÍA, G.; ZAVALETA-AVEJAR, L. **Impact of chitosan based edible coatings functionalized with natural compounds on**

olletotrichum fragariae development and the quality of strawberries. Food Chemistry, v. 262, p. 142–149, 2018.

VICENTE, A. R., COSTA, M. L., MARTINEZ, G. A., CHAVES, A. R., CIVELLO, P. M. **Effect of heat treatments on cell wall degradation and softening in strawberry fruit.** Postharvest Biology and Technology, v. 38, p. 213–222, 2005.

VICENTE, A., MARTÍNEZ, G., CIVELLO, P., CHAVES, A. **Quality of heat-treated strawberry fruit during refrigerated storage** Postharvest Biology and Technology, v. 25, p. 59–71, 2002.

VU, K. D., HOLLINGSWORTH, R.G., LEROUX, E., SALMIERI, S., LACROIX, M.

Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. Food Research International, v. 44, p. 198–203, 2011.

WENG, W., ZHENG, H. **Effect of transglutaminase on properties of tilapia scale gelatin films incorporated with soy protein isolate.** Food Chemistry, v. 169, p. 255–260, 2015.

WSZELAKI, A. L., MITCHAM, E. J. **Effects of superatmospheric oxygen on strawberry fruit quality and decay.** Postharvest Biology and Technology, v. 20, p. 125–133, 2000.

WU, J.; LIU, H.; GE, S.; WANG, S.; QIN, Z.; CHEN, L.; ZHENG, Q.; LIU, Q.; ZHANG, Q. **The preparation, characterization, antimicrobial stability and *in vitro* release evaluation of fish gelatin films incorporated whit cinnamon essential oil nanoliposomes.** Food Hydrocolloids, J., v. 43, p. 427-435, 2015.

XU, F., WANG, S., XU, J., LIU, S., LI, G. **Effects of combined aqueous chlorine dioxide and UV-C on shelf-life quality of blueberries.** Postharvest Biology and Technology, v.117, p. 125-131, 2016.

ZHAO, Y. X., FENG, Z. S., LI, X. W. **Effect of ultrasonic and MA packaging method on quality and some physiological changes of fragrant pear.** Journal of Xinjiang Agricultural University, v. 30, p. 61-63, 2007.

ZHU, S., ZHOU, J. **Effect of nitric oxide on ethylene production in strawberry fruit during storage.** Food Chemistry, v. 100, p. 1517–1522, 2007.

CAPÍTULO 3. CARACTERIZAÇÃO DE COBERTURAS COMESTÍVEIS À BASE DE GELATINA ADICIONADAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE MENTA (*MENTHA ARVENSIS*)

Resumo

Neste capítulo será apresentado a caracterização das coberturas comestíveis adicionadas de óleo essencial de menta (OEM) quanto às propriedades de barreira, propriedades mecânicas, estruturais e de capacidade antifúngica. Cinco concentrações de óleo de menta (0, 0,06, 0,13, 0,25, 0,38, 0,50 % (g/g de gelatina)) foram incorporadas nas soluções das coberturas comestíveis de gelatina. Os filmes foram preparados por *casting* e caracterizados. O óleo adicionado nos filmes aumentou a barreira ao vapor de água, a espessura e a opacidade, e diminuiu a transparência dos filmes. A organização molecular dos filmes foram modificadas pela adição do óleo de menta e concentrações acima de 0,38 % tornaram os filmes mais frágeis e menos homogêneos na superfície. Na concentração de 0,50 % de óleo, o filme foi eficaz contra o crescimento de *Botrytis cinerea* e *Rhysopus stolonifer* sobre a superfície do filme, indicando capacidade antifúngica. O uso de óleos essenciais vem sendo estudado cada vez mais na área de alimentos, especialmente como aditivo em filmes e coberturas comestíveis por apresentarem ampla atividade antimicrobiana, por serem de origem natural e de baixo custo.

3.1 Introdução

Muitos países em desenvolvimento enfrentam sérios problemas na gestão e minimização da quantidade de resíduos sólidos. A quantidade de resíduo gerado cresce anualmente em proporção com o crescimento populacional. Nos últimos anos, o interesse em preservar alimentos de forma segura, natural e de fácil preparo tem aumentado. Nesse sentido, a preocupação com o meio ambiente em reduzir as quantidades e usos de embalagens plásticas à base de polímeros sintéticos. Diversos materiais podem ser utilizados para a formulação de embalagens biodegradáveis para alimentos em forma de filmes e coberturas comestíveis. Materiais à base de proteínas, carboidratos e lipídeos estão sendo estudados em conjunto com outros compostos para que proporcionem melhor barreira entre o ambiente externo e o alimento, prolongando o tempo de vida útil de diferentes produtos. Atualmente, proteínas bovinas e de pescado tem sido estudadas como material de embalagens, com o objetivo de substituir

os polímeros sintéticos, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, boas propriedades de barreira aos gases, mecânicas, compostos voláteis, óleos e luz UV (KANMANI e RHIM, 2014; TONGNUANCHAN et al. 2016). Mas essas propriedades podem variar dependendo da fonte de gelatina utilizada, o tipo do plastificante e emulsificante, entre outros fatores (VANIN et al., 2005).

A proteína bovina (gelatina) é uma fonte promissora para a criação de novas embalagens ativas por possuir boa capacidade de formar filme e manter a qualidade dos alimentos durante o período de armazenamento (PIRES, *et al.*, 2013). Já foi relatado por diferentes autores que filmes à base de gelatina bovina e suína apresentam baixa elasticidade e alta tensão de ruptura (SOBRAL et al., 2001). Obtida pela hidrólise parcial do colágeno, constituinte de peles de animais, ossos e tecidos conjuntivos, é biodegradável, não tóxica e de fácil excreção (GAN *et al.*, 2012). Coberturas comestíveis a partir de gelatina possuem baixa barreira ao vapor de água, devido à natureza hidrofílica das gelatinas e o uso de plastificantes necessários para a formação do filme que também possui caráter hidrofílico (TONGNUANCHAN et al. 2015; LIMPISOPHON et al., 2010). Para melhorar as propriedades de barreira ao vapor de água pode-se fazer uso de compostos ativos durante o preparo dessas embalagens, como por exemplo, o uso de óleos essenciais de plantas, que possuem natureza hidrofóbica. Diferentes tipos de óleos essenciais têm sido utilizados na incorporação em filmes de gelatina (AHMAD et al., 2012; ARFAT et al., 2014; TONGNUANCHAN et al. 2014; TONGNUANCHAN et al. 2015; TONGNUANCHAN et al. 2016).

Estudos demonstram que óleos essenciais, como o de menta, além de comestíveis, possuem capacidade antimicrobiana e antifúngica (KALEMBA e KUNICKA, 2003; GUERRA, *et al.*, 2015). Porém, muitas vezes seu uso é restrito devido à sua toxicidade, custo de aplicação e aroma pungente. Uma forma de minimizar esses efeitos é a formulação de embalagens comestíveis, com concentrações do óleo que mantenham sua eficácia (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011). Sua atividade não está apenas relacionada à atividade antimicrobiana, mas também em melhorar as características físicas e químicas das embalagens. Portanto, o OEM pode ser utilizado como uma barreira para diminuir o desenvolvimento de fungos. A presença do mentol contido no óleo pode evitar contaminações externas e internas aos alimentos. Além disso, o óleo pode atuar como componente hidrofóbico, e reduzir a permeabilidade ao vapor de água das embalagens, evitando a perda de

água dos alimentos durante o armazenamento (ABBASZADEH et al., 2014, GUERRA et al., 2015).

Esta etapa do trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar diferentes coberturas comestíveis à base de gelatina, incorporadas com óleo essencial de menta, e determinar suas propriedades mecânicas, de barreira, estruturais e antifúngicas para posterior aplicação em alimentos.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Materiais

A gelatina bovina utilizada foi do Tipo B (Bloom 250, viscosidade 34 mPa.s, umidade 9 %, cinzas \leq 2 %, pH 5,8) doada por Gelnex *The Gelatin Specialist* (Itá, Santa Catarina, Brasil), óleo essencial de menta (*Mentha arvensis*) (aproximadamente L-mentol = 40 %, mentona = 24 %, acetato de mentila = 4 %, isomentona = 10 %) adquirido da Ferquima Indústria e Comercio LTDA. (Vargem Grande, São Paulo, Brasil), glicerina (C₃H₈O₃), Tween 80 (C₆₄H₁₂₄O₂₆) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). *Rhizopus stolonifer* (CBMAI 1551) foi doado pelo Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina e *Botrytis cinerea* (CBMAI 863) adquirido da Coleção Brasileira de Microorganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI/DRM, UNICAMP, Paulínia, São Paulo.

3.2.2. Formulação e preparo das coberturas comestíveis

A solução das coberturas foi preparada dissolvendo a gelatina 4 % (m/v) com água destilada sob agitação, à temperatura ambiente durante 20 min. Após dissolução, foi adicionado 0,13 % de glicerol (g/g gelatina) e 0,06 % de Tween 80 (g/g gelatina) e a mistura foi aquecida em banho maria a 80 °C por 10 min. Na sequência, a mistura foi resfriada até 27 °C, seguida da adição do OEM (0; 0,06; 0,13; 0,25; 0,38; 0,5 % (g/g gelatina)) e homogeneizada em um Ultra-Turrax T25 IKA-Werke (Staufen, Germany) a 14.500 rpm por 3 min. As bolhas foram retiradas sob vácuo. Para a formação dos filmes, 20 g de solução foram colocadas em placas de acrílico de 15 cm de diâmetro e armazenadas a 25 °C por 24 h para secagem. Os filmes formados foram retirados das placas, cortados e armazenados a 58 % UR a 25 °C por 48 h até a realização das análises, exceto para ensaio antifúngico, onde os filmes foram utilizados logo após

a secagem. O método utilizado foi adaptado a partir do método descrito por Tongnuanchan et al., (2015).

3.2.3. Caracterização dos filmes

3.2.3.1 Espessura

As espessuras dos filmes foram determinadas utilizando-se micrômetro digital (Mitutoyo, MDC-25P, Japão) com precisão de 0,001 mm. Os resultados foram obtidos pela média aritmética de 8 medidas aleatórias da superfície de cada corpo de prova.

3.2.3.2 Opacidade

A opacidade foi analisada por transmitância total, em colorímetro Ultra Scan Vis 1043 (Hunter Lab, Reston, EUA), utilizando a escala CIELab*. As medidas realizadas foram expressas em termos dos parâmetros L^* (Luminosidade), a^* ($+a^*$ =vermelho e $-a^*$ =verde) e b^* ($+b^*$ =amarelo e $-b^*$ =azul), sendo verificada a opacidade (0 a 100 %) das amostras calculadas automaticamente pelo próprio *software* do equipamento (VANIN, et al., 2005).

3.2.3.3 Transparência

Para determinação da transparência foram utilizadas amostras dos filmes de 2,5 cm x 9,0 cm. As amostras foram adaptadas no caminho óptico do equipamento. A transparência foi medida pela transmitância (%) do conjunto a 500 nm, medida em um espectrofotômetro (SQ-2800 UV/VIS, UNICO, United Products & Instruments Inc., Nova Jersey, EUA). A transmitância total (100% T) foi determinada com uma cubeta vazia (TANG *et al.*, 2005).

3.2.3.4 Permeabilidade ao Vapor de Água

A permeabilidade dos filmes ao vapor de água (K^W) foi determinada por gravimetria a 25 °C (FADINI *et al.*, 2013), de acordo com método ASTM E96/E96 M-5. Cápsulas de difusão foram preenchidas com sílica gel (0% UR), cobertas com o filme, seladas e armazenadas em câmara à 75 % UR. O ganho de massa de cada célula foi determinado por pesagens sucessivas em balança analítica (Shimadzu,

AY220, Brasil) com intervalos de 1 h em 1 h até 12 h e após 24 h. A permeabilidade dos filmes foi calculada pela Equação 1:

$$PVA = \frac{W \times L}{A \times p_s (a_{w_1} - a_{w_2})} \quad (1)$$

Sendo: W a taxa de ganho de massa (água) pela célula de difusão (g/s), L a espessura (m), A a área (m²), p_s a pressão de saturação do vapor de água (Pa) e a_{w1}, a_{w2}, são as atividades de água nas condições externa e interna da célula, respectivamente.

3.2.3.5 Propriedades Mecânicas

Os parâmetros tensão de ruptura (MPa) e alongação (%) dos filmes foram determinados utilizando texturômetro tipo Universal Testing Machine (modelo TA-TX plus, Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra), de acordo com método ASTM D882-00 (ASTM, 2002), em filmes com dimensões de 9,0 cm de comprimento e 2,5 cm de largura. Foram realizadas 8 medidas em cada amostra de filme. As espessuras dos filmes foram medidas antes de cada análise e tomadas em quatro pontos aleatórios com auxílio de um micrômetro digital (Mitutoyo, MDC-25P, Japão). As determinações foram realizadas a 25 °C por 3 min para que as condições da sala não interferissem nos resultados.

3.2.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A superfície e seção transversal dos filmes, previamente fraturados em nitrogênio líquido, foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) com sensor de elétrons secundários retroespalhados (JEOL, JSM-6390LV, Japão) a uma voltagem de aceleração de 15 kV. Foram observadas ampliações de 1000 x para a superfície e de 1500 x para a seção transversal dos filmes. Os filmes foram previamente recortados em retângulos pequenos de 1,0 cm por 0,5 cm, fixados em um suporte cilíndrico metálico e recobertos por uma fina camada de ouro, utilizando equipamento metalizador (Baltec, SCD 0005, Japão). As micrografias foram obtidas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2.3.7 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

O microscópio confocal de varredura a laser Leica modelo TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) foi utilizado para avaliar a incorporação e distribuição das gotículas do OEM nos filmes. As imagens foram capturadas com uma lente objetiva de 63 x com imersão em óleo. O laser foi ajustado para modo de fluorescência verde que originou comprimento de onda de 514 nm. As imagens obtidas foram analisadas no *software* Leica Application Suite - LAS AF lite – TCS MP5 (Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Alemanha).

Anteriormente à formação dos filmes, o óleo de menta foi corado com Vermelho de Nilo (0,004 mg/10 mL de óleo) até solubilização completa. Em seguida, os filmes foram formados seguindo o método já descrito anteriormente. Para a análise no microscópio confocal, os filmes foram cortados (diâmetro = 1,5 cm) e sobrepostos entre uma lâmina de vidro e uma lamínula fixada nas laterais com adesivo (BERTAN et al., 2005).

3.2.3.8 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Os espectros de infravermelho dos filmes foram obtidos usando um espectrômetro FTIR (Agilent, modelo Carry 660, EUA) com um acessório de refletância total atenuada horizontal (ZnSe). Com essa análise foi avaliada a interação do óleo essencial de menta com a matriz proteica dos filmes à base de gelatina. As amostras foram colocadas diretamente sobre o cristal e foram executadas uma média de 20 varreduras no intervalo de 4000 – 650 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} para cada amostra, como descrito por Tongnuanchan et al. (2015). As medidas das amostras foram descontadas pelo *background* de ar, isto é, sem amostra sobre o cristal. Três réplicas foram executadas para cada filme.

3.2.3.9 Ângulo de Contato e Energia Livre Superficial

Os ângulos de contato dos filmes foram medidos por equipamento tensiômetro Tracker-S (Teclis Sarl, Longessaigne, França) seguindo método proposto por Rotta et al., (2009), com algumas modificações. Amostras dos filmes de 1 cm x 5 cm foram sobrepostas em uma superfície plana. Uma gota de 1 μL dos líquidos padrão (água, formamida e diiodometano) foi gerada por uma microseringa com graduação automática e aplicada, separadamente, sobre a superfície dos filmes. O ângulo de contato foi calculado pela média dos valores do ângulo esquerdo e direito da gota, a partir da imagem digitalizada da gota.

As medições foram realizadas em até 30 s para evitar a absorção do líquido pelo filme. A temperatura da sala foi mantida em 23 °C e foram realizadas 4 medições repetidas para cada líquido em cada formulação de filme. A energia livre superficial e suas componentes (polar e dispersiva) foram calculadas pelo método de Owens-Wendt (1969) (Eqs. (2) e (3)):

$$\gamma_s^T = \gamma_s^d + \gamma_s^p \quad (2)$$

$$\gamma_L(1 + \cos\theta) = 2 \left(\sqrt{\gamma_s^d \gamma_L^d} + \sqrt{\gamma_s^p \gamma_L^p} \right) \quad (3)$$

Sendo: γ^T a energia livre superficial total, γ^d a energia livre superficial dispersiva (apolar), γ^p a energia livre superficial não dispersiva (polar).

3.2.3.10 Capacidade Antifúngica

A capacidade antifúngica dos filmes de gelatina com e sem óleo de menta foi avaliado *in vitro* contra *Rhizopus stolonifer* e *Botrytis cinerea*. O ensaio iniciou com a inoculação de 0,1 mL da suspensão de esporos (10^5 esporos/mL) na superfície das placas de Petri com meio BDA (Ágar Batata Dextrose). Os filmes (diâmetro = 2,0 cm), cortados previamente com lâmina cilíndrica, foram posicionados no centro das placas, que foram então incubadas a 26 °C durante 3 dias para *R. stolonifer* e 26 °C durante 5 dias para *B. cinerea*. A capacidade antifúngica dos filmes foi determinada pela medida do diâmetro da zona de inibição do crescimento fúngico em volta do filme com um paquímetro Mitutoyo (Kawasaki, Japão). Os ensaios foram realizados em duplicata para cada filme (PERDONES et al., 2014).

A capacidade antifúngica do óleo essencial de menta foi determinada seguindo o mesmo método de difusão em disco descrito anteriormente, com modificações descritas por Alexandre et al. (2016). Foi utilizado papel de filtro estéril (diâmetro = 2,0 cm) impregnado com 5 µL do óleo essencial de menta. Foram utilizados discos impregnados com óleo de soja como controle positivo e etanol absoluto como controle negativo. Essa análise visou caracterizar o OEM utilizado quanto à sua capacidade antifúngica contra *B. cinerea* e *R. stolonifer*.

3.2.3.11 Análises Estatísticas

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) usando *software* Statistica 10 (Stafsoft Inc., EUA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1 Espessura, Transparência e Opacidade

A espessura, transparência e opacidade dos filmes de gelatina incorporados com diferentes concentrações de OEM estão apresentadas na Tabela 3.1. A espessura dos filmes adicionados do óleo aumentou quando comparada com o filme controle (sem OEM), variando de 41,1 a 44,0 μm . Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) na espessura entre as concentrações mais baixas de óleo (0,06 %, 0,13 % e 0,25 %) e o filme controle. As diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao filme controle foram observadas apenas para as amostras contendo maiores concentração de óleo (0,38 % e 0,50 %). A variação da espessura dos filmes pode estar relacionada apenas com o simples aumento do teor de sólidos ou devido as cadeias de peptídeos da gelatina não conseguirem formar uma rede compacta na presença do óleo, segundo Ahmad *et al.* (2012) e Tongnuanchan *et al.* (2015), que obtiveram resultados semelhantes para filmes à base de gelatina de peixe incorporados com óleos essenciais em diferentes concentrações.

Por outro lado, a transparência dos filmes contendo OEM diminuiu em relação ao filme controle. Essa redução da transparência foi significativa ($p < 0,05$) a partir de 0,25 % OEM na formulação. A transparência não foi afetada ($p > 0,05$) pela adição do óleo nas concentrações de 0,06 % e 0,13 %, em relação ao filme controle. Segundo Ahmad *et al.* (2012), a incorporação de diferentes concentrações de óleos essenciais de bergamota e citronela em filmes de gelatina apresentaram redução nos valores da transparência. Para Rauwendaal (2001), citado por Ahmad *et al.* (2012), em materiais transparentes, a heterogeneidade na composição do material pode ocasionar mudanças significativas das propriedades ópticas. Pires *et al.* (2011) explicaram que a adição de diferentes óleos essenciais em filmes de gelatina resultou em menor transparência quando comparados com os filmes sem óleo. Os autores explicaram que os filmes adicionados do óleo foram claros o suficiente para serem usados como embalagens ou como material de revestimento

de alimentos. A diminuição da transparência também foi relatada por Tongnuanchan et al. (2014) e Tongnuanchan et al. (2015), em estudos com filmes de gelatina de peixe incorporado com óleos essenciais.

As propriedades ópticas dos filmes são um atributo que podem influenciar na aparência do produto, valor comercial e adequação para diferentes aplicações (AHMAD, *et al.*, 2012). A opacidade dos filmes aumentou com o aumento da concentração do óleo, variando de 13,0 % a 18,0 %, conseqüentemente diminuindo a transparência característica dos filmes de gelatina. Em vários estudos com filmes de gelatina foi possível observar esse aumento na opacidade quando na presença de óleos essenciais. Kavooosi *et al.* (2014) caracterizaram filmes de gelatina adicionados de óleo essencial de *Zataria* e observaram aumento da opacidade com o aumento da concentração do óleo. O mesmo foi observado por Ahmad *et al.* (2012) e por Ma *et al.* (2012) que observaram aumento da opacidade de filmes de gelatina adicionados de diferentes concentrações de óleos essenciais, devido provavelmente à presença da coloração amarelo do óleo.

Embora a opacidade dos filmes tenha sido afetada pela adição do OEM, a diminuição na transparência não impede a aplicação como revestimento em alimentos de uma dessas formulações.

3.3.2 Permeabilidade ao Vapor de Água

Os resultados da permeabilidade ao vapor de água (PVA) para os filmes à base de gelatina adicionados de diferentes concentrações de OEM estão apresentados na Tabela 3.1. Reduções significativas ($p < 0,05$) dos valores da PVA foram obtidas para formulações com menor concentração de óleo (0,06 %, 0,13 % e 0,25 %) comparadas ao controle. Enquanto que, as amostras contendo 0,38 % e 0,50 % de OEM não diferiram significativamente ($p > 0,05$) em relação ao filme sem óleo. O filme à base de gelatina possui baixa barreira aos vapores de água devido à característica hidrofílica das moléculas de gelatina (DANGARAN, TOMASULA e QI, 2009). A adição do OEM proporcionou características hidrofóbicas para todos os filmes, sendo menos pronunciada para os filmes com 0,38 % e 0,50 % de óleo. Esses resultados podem estar relacionados à distribuição heterogênea do OEM na matriz desses filmes, podendo ser observada nas imagens de MEV (Figura 3.1) e MCVL (Figura 3.2), as quais apresentaram estrutura desordenada e pequenos aglomerados de gotículas de óleo na matriz, respectivamente, foi facilitada. Desta forma, a difusão de vapores de água através dos

filmes. Quando a distribuição de óleo é mais homogênea na matriz, ocorre aumento do fator de tortuosidade da difusão de vapor de água através dos filmes, como ocorreu para as amostras de menor concentração de óleo (0,06 %, 0,13 % e 0,25 %). Por isso, não é correto afirmar que a simples adição de um componente hidrofóbico na matriz de filmes comestíveis irá reduzir a permeabilidade ao vapor de água. A microestrutura, tamanho das gotículas e distribuição do óleo na matriz dos filmes são características importantes para entender as propriedades de barreira a água de filmes incorporados com lipídeos (MA et al., 2012).

Pires *et al.* (2011) caracterizaram filmes de gelatina de peixe incorporados com diferentes óleos essenciais de citronela, coentro, estragão e tomilho e relataram redução nos valores da permeabilidade ao vapor de água dos filmes com os óleos quando comparados ao filme sem óleo, demonstrando maior hidrofobicidade dos filmes que continham os diferentes óleos essenciais. O mesmo foi relatado por Ahmad *et al.* (2012), para filmes de gelatina adicionados com diferentes concentrações de óleo essencial de capim-limão, em que os valores da PVA diminuíram com aumento da concentração de óleo no filme. Entretanto, quando os mesmos autores estudaram filmes de gelatina incorporados com diferentes concentrações de óleo essencial de bergamota, efeito contrário foi observado, um aumento da PVA, com aumento da concentração do óleo. Isto ocorreu, segundo os autores, devido às diferenças na natureza higroscópica dos óleos estudados, o que ocasionou mudança na afinidade de moléculas de água pela rede do filme.

Tabela 3.1 – Espessura, Transparência, Opacidade e PVA dos filmes de gelatina incorporados com óleo essencial de menta (OEM) em diferentes concentrações.

Formulações (% OEM)	Espessura (μm)	Transparência (%)	Opacidade (%)	PVA ($\times 10^{-4}$ $\text{g}\cdot\text{mm}/\text{m}^2\cdot\text{Pa}\cdot\text{h}$)
Controle (0)	$37,0 \pm 4,0$ _a	$83,3 \pm 1,0$ _a	$11,0 \pm 1,0$ _a	$1,55 \pm 0,08$ _a
A ₁ (0,06)	$41,0 \pm 1,3$ _{ab}	$82,0 \pm 1,0$ _{ab}	$13,0 \pm 1,0$ _b	$1,12 \pm 0,02$ _b
A ₂ (0,13)	$42,0 \pm 3,3$ _{ab}	$81,2 \pm 1,1$ _{ab}	$13,1 \pm 1,0$ _b	$1,11 \pm 0,06$ _b
A ₃ (0,25)	$43,0 \pm 2,1$ _{ab}	$80,0 \pm 1,0$ _{bc}	$14,0 \pm 1,0$ _b	$1,10 \pm 0,07$ _b
A ₄ (0,38)	$43,0 \pm 2,1$ _b	$77,4 \pm 2,0$ _{cd}	$16,0 \pm 1,0$ _c	$1,46 \pm 0,01$ _a
A ₅ (0,50)	$44,0 \pm 2,0$ _b	$76,3 \pm 1,3$ _d	$18,0 \pm 1,0$ _c	$1,51 \pm 0,06$ _a

*Letras iguais nas colunas para o mesmo parâmetro significam que as amostras não diferem significativamente com base no teste de Tukey ($p > 0,05$).

3.3.3 Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes de gelatina incorporados com OEM estão apresentadas na Tabela 3.2. A tensão de ruptura dos filmes foi afetada pela incorporação do óleo. O óleo adicionado aos filmes causou redução significativa ($p < 0,05$) nos valores de tensão de ruptura, variando de 32,1 MPa a 27,0 MPa. A presença de menores concentrações do óleo causou aumento nos valores da elongação dos filmes contendo 0,06 %, 0,13 % e 0,25 % de óleo, sendo significativo ($p < 0,05$) apenas para a amostra de menor concentração 0,06 %, quando comparada ao filme controle. Para as amostras contendo maior concentração de óleo (0,38 % e 0,50 %) os valores da elongação diminuíram. Resultado que corrobora com os valores do módulo de Young (Tabela 3.2), que diminuíram significativamente ($p < 0,05$) com aumento da concentração do óleo, indicando que os filmes ficaram menos rígidos que o filme controle, uma vez que o módulo de Young mostra a rigidez intrínseca dos filmes (KANMANI e RHIM, 2014).

Com isso, os resultados das propriedades mecânicas indicam que a incorporação do OEM em concentrações altas resultou na formação de filmes frágeis, menos rígidos e menos resistentes, consistente com os resultados para permeabilidade ao vapor de água (Tabela 3.1) e das

imagens das micrografias (Figura 3.1 e 3.2), as quais mostraram estrutura heterogênea de distribuição irregular do óleo na matriz desses filmes. Os resultados estão de acordo com Ahmad *et al.* (2012) e Kavooosi *et al.* (2014) que relataram que o aumento da concentração de diferentes óleos essenciais em filmes de gelatina provocou reduções dos valores da tensão de ruptura, alongação e módulo de Young.

A incorporação de concentrações menores de óleo (0,06 %, 0,13 % e 0,25 %) resultou no aumento da flexibilidade dos filmes, como resultado da diminuição da tensão de ruptura e módulo de Young, com simultâneo aumento da alongação, caracterizando efeito plastificante do OEM na matriz dos filmes nessas concentrações.

Tabela 3.2 – Resistência à tração, alongação e módulo de Young dos filmes de gelatina incorporados com óleo essencial de menta (OEM) em diferentes concentrações.

Formulações (% OEM)	Tensão de Ruptura (MPa)	Elongação (%)	Módulo de Young (MPa)
Controle (0)	41,0 ± 2,0 _a	13,3 ± 2,2 _{ac}	1596,0 ± 60,2 _a
A ₁ (0,06)	32,1 ± 3,0 _b	18,1 ± 3,0 _b	1118,3 ± 97,4 _{bc}
A ₂ (0,13)	32,4 ± 2,0 _b	17,0 ± 2,3 _{ab}	1187,0 ± 106,0 _{bc}
A ₃ (0,25)	32,0 ± 3,0 _b	15,2 ± 2,0 _{ab}	1258,0 ± 111,0 _b
A ₄ (0,38)	29,0 ± 2,1 _{bc}	11,1 ± 2,0 _c	1047,0 ± 82,2 _c
A ₅ (0,50)	27,0 ± 3,0 _c	10,0 ± 1,3 _c	1048,3 ± 117,2 _c

*Letras iguais nas colunas para o mesmo parâmetro significam que as amostras não diferem significativamente com base no teste de Tukey ($p > 0,05$).

3.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias dos filmes obtidas por MEV estão apresentadas na Figura 3.1. O filme controle (sem OEM) mostrou uma superfície lisa, com presença de microbolhas de ar, que provavelmente, não foram removidas da solução no tempo sob vácuo. Na seção transversal do filme controle (Controle (sem OEM) b) a estrutura apresentada é homogênea, compacta e pouco rugosa, sem presença de agregados, quando comparada com os filmes adicionados do óleo, mostrando que se formou uma matriz

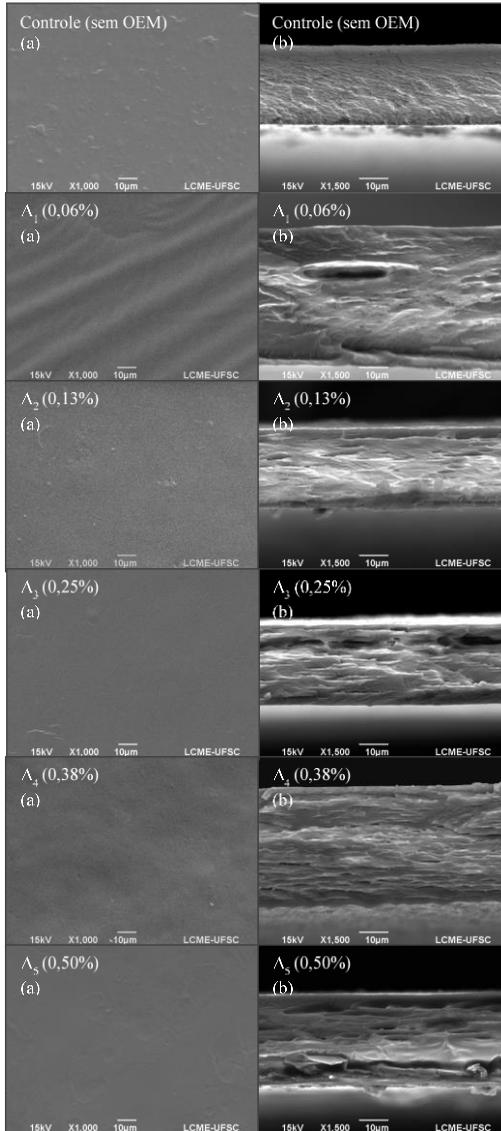
homogênea. De acordo com estudos da literatura, é comum filmes puros de gelatina apresentarem essas características observadas no presente estudo (ARMAD et al., 2012; TONGNUANCHAN et al., 2014; TONGNUANCHAN et al., 2015; MARTUCCI et al., 2015).

Os filmes incorporados com OEM, quando comparados ao controle, apresentaram superfícies mais lisas e homogêneas, com exceção do filme contendo 0,50 % de óleo, o qual apresentou pontos de coalescência do óleo. Esses resultados sugerem que a adição de 0,50 % de óleo não foi capaz de se distribuir totalmente à matriz proteica do filme, fazendo com que algumas gotículas do óleo fossem expulsas da rede do filme e migrassem para a superfície superior do filme durante a secagem.

Nas morfologias das seções transversais dos filmes adicionados de óleo foi possível observar maior rugosidade na matriz, sabendo que foi a adição do óleo nos filmes que, provavelmente, diminuiu a interação proteína-proteína, ocasionando a rugosidade dos filmes (TONGNUANCHAN et al., 2015). As amostras com concentrações menores de OEM (0,06 %, 0,13 % e 0,25 %) apresentaram estruturas menos rugosas e mais compactas que os filmes com 0,38 % e 0,50 % de óleo, indicando uma melhor distribuição do óleo na matriz desses filmes. A presença de porções aglomeradas do OEM, estrutura desordenada e descontínua foram observadas na fratura do filme com 0,50 % de óleo. Isso pode ser atribuído à alta concentração de óleo que prejudicou a estrutura tridimensional das proteínas, podendo ser explicado a propriedade de barreira ao vapor de água enfraquecida dessa amostra.

Tongnuanchan et al. (2014) explicaram que as gotículas de óleo podem servir como barreira ao vapor de água por serem de natureza hidrofóbica. Entretanto, sua distribuição deve ser homogênea em toda a matriz do filme. Assim, por meio das micrografias do presente estudo, pode-se concluir que o OEM teve maior interação e foi melhor distribuído na matriz dos filmes de menor concentração (0,06 %, 0,13 % e 0,25 %) do que os de maior concentração (0,38 % e 0,50 %), dificultando a passagem dos vapores de água através dos filmes e proporcionando maior hidrofobicidade. Esses resultados podem ser associados às propriedades dos filmes, particularmente, aos valores reduzidos da PVA dessas formulações em comparação ao filme controle.

Figura 3.1 – Microscopia eletrônica de varredura dos filmes de gelatina incorporados com óleo essencial de menta (OEM) em diferentes concentrações. Superfície superior (a) e Fratura transversal (b).



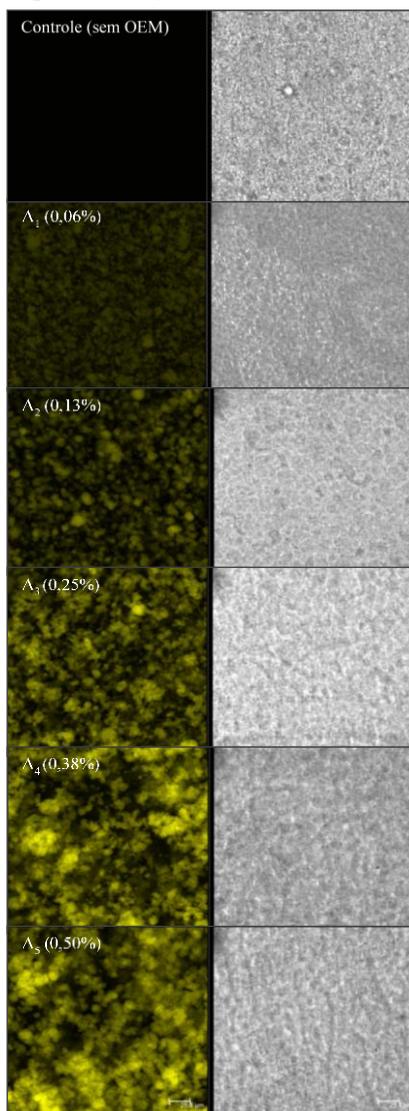
Fonte: Autor.

3.3.5 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

A distribuição das gotas do OEM (amarelo) na matriz dos filmes (preto) está mostrada pela Figura 3.2, obtida por microscopia confocal de varredura a laser. A imagem Controle (sem OEM) representa o filme de gelatina sem adição de óleo essencial, não demarcado com corante Vermelho do Nilo. À medida que as concentrações de OEM aumentaram, foi observado aumento no número de gotas de óleo na matriz dos filmes. Nenhum agregado das gotas de óleo foi observado para os filmes de gelatina com 0,06 %, 0,13 % e 0,25 % de óleo, podendo indicar que a distribuição das gotículas de óleo de menta após processo de homogeneização e secagem apresentou homogeneidade em toda a matriz desses filmes. A maioria das gotículas dessas amostras apresentaram tamanhos aproximadamente iguais ($< 9 \mu\text{m}$), as quais podem ter promovido tortuosidade para a dispersão dos vapores de água através da matriz desses filmes, explicando a redução nos valores de PVA das amostras contendo 0,06 %, 0,13 % e 0,25 % de OEM. O sinal de agregados lipídicos ocorreu com o aumento da concentração de óleo, observado nas imagens das amostras com 0,38 % e 0,50 % de óleo de menta. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que as gotículas lipídicas grandes possuem maior dificuldade para se incorporarem às cadeias protéicas quando em formulações de filmes compostos, podendo causar rompimento da estrutura da matriz, promovendo a perda nas propriedades de barreira à umidade dos filmes (GONTARD et al., 1994). Sendo assim, a etapa de homogeneização das soluções de filme de maior concentração (0,38 % e 0,50 %) pode não ter sido suficiente para promover redução homogênea no tamanho das gotículas do óleo e melhorar a incorporação do mesmo na matriz dos filmes.

Assim, a técnica de MCVL tem potencial para explicar a distribuição do óleo incorporado nas amostras de filmes à base de gelatina esclarecendo as diferenças nas propriedades de barreira e mecânicas dos filmes.

Figura 3.2 – Microscopia confocal de varredura a laser dos filmes de gelatina incorporados com óleo essencial de menta (OEM) em diferentes concentrações. Barra indicativa de tamanho representa 25 μm .



Fonte: Autor.

3.3.6 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

A análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier foi realizada para avaliar as interações entre o OEM e a matriz da gelatina. Os resultados são representados na Figura 3.3. O filme controle e os filmes adicionados de diferentes concentrações do óleo apresentaram espectros com bandas principais característicos de proteínas, variando apenas a amplitude dos picos, conforme a concentração de óleo adicionada. As bandas com número de onda 1045 cm^{-1} foram encontradas em todas as amostras de filmes, provavelmente, devido à interação da proteína ($-\text{CH}_2$ de resíduo de aminoácidos de moléculas de gelatina) e o plastificante (grupos OH do glicerol) (BERGO e SOBRAL, 2007). Observou-se que a amplitude dessas bandas aumentou com a incorporação das diferentes concentrações de óleo de menta nos filmes.

Os espectros dos filmes apresentaram, também, bandas na região da amida com bandas a 1645 cm^{-1} (Amida I), 1548 cm^{-1} (Amida II) e 1243 cm^{-1} (Amida III), estando de acordo com os relatados por Ahmad et al. (2012), Tongnuanchan et al. (2015), Tongnuanchan et al. (2016) para filmes à base de gelatina. A Amida I indica ligação $\text{C}=\text{O}$ /ligação de hidrogênio acoplada com $\text{C}-\text{N}$ e deformação CCN , Amida II as vibrações de flexão de grupos $\text{N}-\text{H}$ e vibrações de alongamento dos grupos $\text{C}-\text{N}$ e a Amida III ilustram as vibrações no plano de grupos $\text{C}-\text{N}$ e $\text{N}-\text{H}$ da amida ligada ou vibrações de CH_2 de grupos glicina e prolina (BERGO e SOBRAL, 2007; TONGNUANCHAN et al., 2015). As amplitudes da Amida I, II, e III foram menores para o filme controle comparadas às dos filmes incorporados com o óleo de menta. A adição do óleo de menta nos filmes provocou, provavelmente, uma menor interação intermolecular entre os componentes das formulações durante o processo de secagem do filme (AHMAD et al., 2012), correlacionando à redução nos valores da resistência a tração dos filmes adicionados de óleo. Wu et al. (2015) também encontraram espectros semelhantes da Amida I, II e III para filmes de gelatina de peixe incorporados com nanolipossomas de óleo essencial de canela com valores de número de onda de 1642 cm^{-1} , 1552 cm^{-1} e 1237 cm^{-1} , respectivamente, e também observaram que as amplitudes das Amidas I, II e III foram maiores para o filme com nanolipossomas do óleo. Em estudo realizado por Tongnuanchan et al. (2015), sobre filmes elaborados com gelatina de peixe e óleo de palma, os resultados estão de acordo com o presente estudo. Estes autores relataram valores de número de onda de 1630 cm^{-1} , 1538 cm^{-1} e 1237 cm^{-1} .

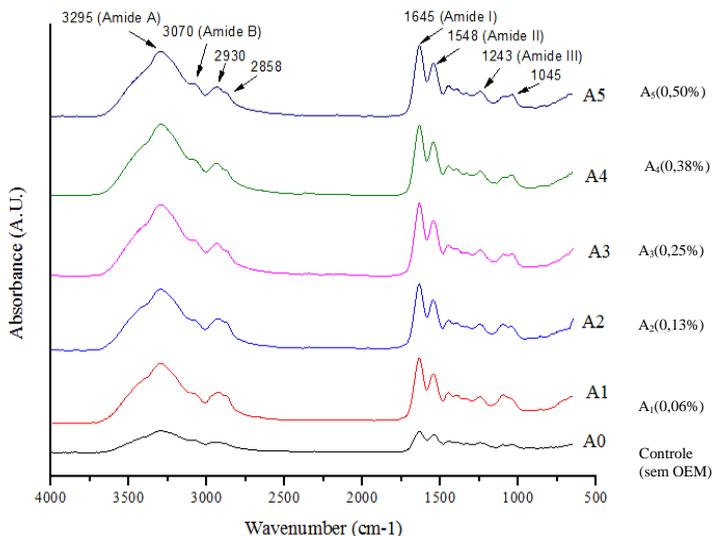
¹ para Amidas I, II e III, respectivamente, porém as amplitudes das bandas diminuíram com o aumento da concentração de óleo de palma nos filmes. Assim, concluíram que tal fato se deve ao menor teor de proteínas nos filmes contendo óleo de palma.

Bandas de número de onda de 2858 cm^{-1} e 2930 cm^{-1} também foram observadas em todas as amostras dos filmes no presente estudo, com maior intensidade e área para os filmes adicionados de OEM, sendo atribuídas às vibrações de alongamento assimétricas e simétricas do tipo alifáticos C-H em grupos CH_2 e CH_3 , respectivamente. Essas bandas apresentaram maior intensidade na presença de componentes hidrofóbicos, como os lipídeos. Dessa maneira, filmes contendo diferentes concentrações de OEM indicaram a presença de hidrocarbonetos que causam vibrações nessas bandas, consequentemente alterando a organização molecular e interação intermolecular na matriz do filme (AHMAD et al. 2012; TONGNUANCHAN et al. 2015; TONGNUANCHAN et al. 2016).

Em todas as amostras de filmes foram observadas bandas relativa a Amida A e Amida B, que apareceram nas bandas 3295 cm^{-1} e 3070 cm^{-1} , respectivamente. Amida A (3295 cm^{-1}) representa vibrações de alongamento do grupo NH- com ligações de hidrogênio e Amida B (3070 cm^{-1}) representa vibrações de alongamento CH (AHMAD et al. 2012). As diferentes concentrações de óleo de menta nos filmes não variaram o número de onda das bandas de Amida A e Amida B, que, por conseguinte, não deslocaram para números de ondas mais elevados. Tongnuanchan et al. (2015) relataram em seus estudos com filmes de gelatina de peixe, incorporado com diferentes concentrações de óleo de palma, que as bandas de Amida A e Amida B foram deslocadas para maiores números de onda quando foram adicionadas maiores concentrações de óleo de palma, quando comparados ao filme controle. Bahram et al. (2014) explicam que essas alterações no número de onda e amplitude de picos pode ocorrer devido à interação entre os grupos funcionais de proteínas e o óleo.

A partir dos resultados dos espectros de infravermelho, observa-se uma alteração da organização molecular e intermolecular na matriz do filme contendo OEM, impedindo uma melhor interação proteína-proteína na matriz. Sendo assim, filmes de gelatina puros, sem adição de um agente hidrofóbico podem apresentar maior organização molecular, porém são inferiores quanto às propriedades mecânicas e de barreira a água quando comparados aos filmes de gelatina adicionados OEM.

Figura 3.3 – Espectros de infravermelho dos filmes de gelatina incorporados com óleo essencial de menta (OEM) em diferentes concentrações.



Fonte: Autor.

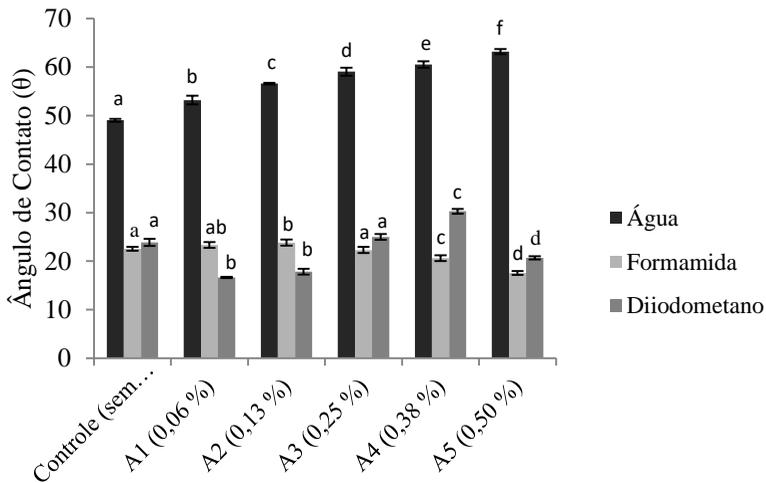
3.3.7 Ângulo de Contato, Energia Livre Superficial e Molhabilidade

Na Figura 3.4 estão apresentados os valores dos ângulos de contato dos líquidos padrão: água, formamida e diiodometano, dispensados sobre as superfícies dos filmes adicionados de diferentes concentrações de OEM. Na Figura 3.5 se observa as fotos das gotas dos padrões sobre as superfícies dos filmes, representando a molhabilidade. O estado final da gota de água sobre a superfície dos filmes é tomado como indicador da molhabilidade das superfícies dos filmes. O ângulo de contato serve como um indicador para estabelecer o grau de hidroflicidade ou hidrofobicidade e a capacidade de molhabilidade de filmes (SU et al., 2010). Geralmente, filmes que apresentam ângulo de contato com a água maior que 65° são consideradas superfícies hidrofóbicas (VOGLER, 1998).

Em comparação com o filme controle, a adição de diferentes concentrações de OEM teve efeito significativo ($p < 0,05$) sobre o ângulo de contato da água (polar). O ângulo de contato da água variou de $49,0^\circ$ a $63,1^\circ$, indicando um aumento do caráter hidrofóbico dos filmes com o aumento da concentração de óleo incorporado. Os menores ângulos de contato foram encontrados utilizando os líquidos formamida de

polaridade intermediária e diiodometano que é apolar, variando de $24,0^\circ$ a $17,4^\circ$ e $30,2^\circ$ a $17,0^\circ$, respectivamente. O menor ângulo entre a água e o filme controle (sem OEM) pode ser atribuído à capacidade de ligação da água com o plastificante (glicerol) e grupos funcionais da gelatina (OJAGH et al., 2010). Fica claro que a hidrofobicidade do OEM foi fator importante para a redução dos valores da PVA dos filmes adicionados do óleo.

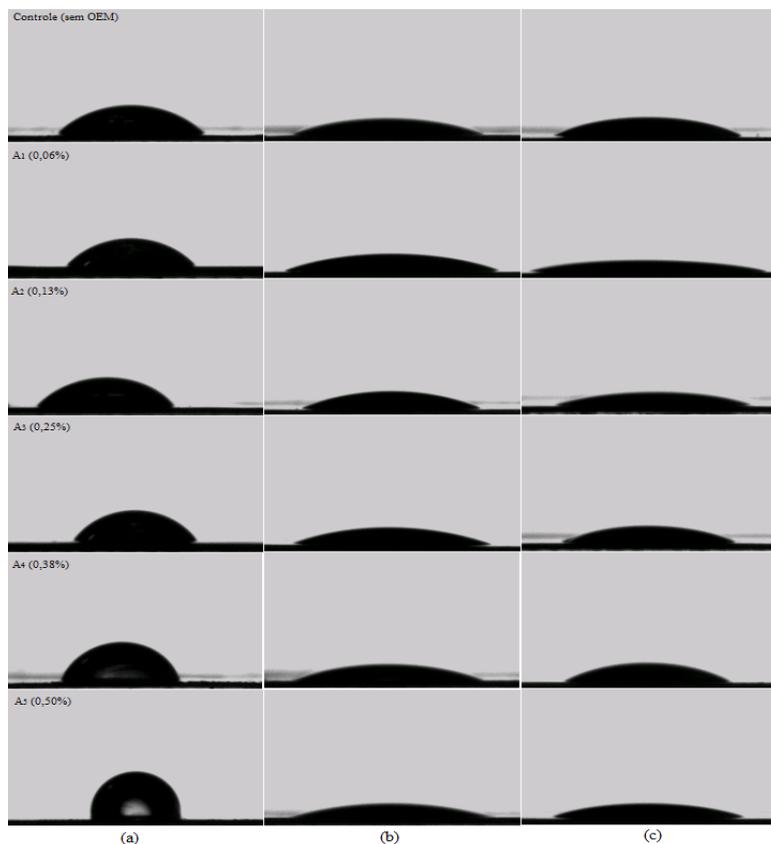
Figura 3.4 – Ângulos de contato dos líquidos padrões água, formamida e diiodometano sobre os filmes de gelatina incorporados com óleo essencial de menta (OEM) em diferentes concentrações



Fonte: Autor.

*Letras iguais nas colunas para o mesmo parâmetro significam que as amostras não diferem significativamente com base no teste de Tukey ($p > 0,05$).

Figura 3.5 – Molhabilidade dos filmes com os líquidos padrões: água (a), formamida (b) e diiodometano (c)



Fonte: Autor.

A partir dos ângulos de contato obtidos com os líquidos sobre as superfícies dos filmes, determinou-se a energia livre superficial dos filmes utilizando o modelo de Owens e Wendt (1969). Na Tabela 3.3 estão apresentados os valores de energia livre superficial e as componentes polares e dispersivas para os diferentes filmes estudados. Os valores das componentes polares da energia livre superficial dos filmes foram menores do que os valores das componentes dispersivas. Isto pode caracterizar os filmes como hidrofóbicos. Os valores encontrados para o ângulo de contato indicaram que a água (componente polar) foi o líquido que apresentou menor interação com os filmes.

Quanto mais hidrofílico for o filme, maior será a energia livre superficial polar e menor a energia livre superficial dispersiva (apolar) (ROTTA et al., 2009; COZMUTA et al., 2015). No presente estudo, os filmes à base de gelatina adicionados de OEM tendem a apresentar características hidrofóbicas, uma vez que o aumento das concentrações de óleo de menta nas formulações ocasionou diminuição da componente polar de 17,0 para 8,3 mN.m⁻¹ e aumentou a componente dispersiva de 43,0 para 48,3 mN.m⁻¹.

Vale ressaltar que os valores inferiores das permeabilidades ao vapor de água dos filmes incorporados com óleo de menta estão em concordância com os resultados dos ângulos de contato com a água, os quais apresentaram valores elevados com o aumento da concentração de óleo nas formulações.

Tabela 3.3 – Energia livre superficial, componente polar e componente dispersiva dos ângulos de contato sobre os filmes de gelatina incorporados com óleo essencial de menta (OEM) em diferentes concentrações.

Formulações (% OEM)	Energia Livre Superficial (mN.m ⁻¹)	Componente Polar (mN.m ⁻¹)	Componente Dispersiva (mN.m ⁻¹)
Controle (0)	59,2 ± 0,3 _a	17,0 ± 0,1 _a	43,0 ± 0,1 _a
A ₁ (0,06 %)	59,0 ± 0,3 _a	13,3 ± 0,5 _b	45,3 ± 0,2 _b
A ₂ (0,13 %)	58,0 ± 0,1 _b	12,0 ± 0,1 _c	46,1 ± 0,2 _c
A ₃ (0,25 %)	56,2 ± 0,3 _c	11,0 ± 0,4 _d	45,4 ± 0,2 _b
A ₄ (0,38 %)	55,1 ± 0,2 _d	11,0 ± 0,3 _d	44,4 ± 0,2 _d
A ₅ (0,50 %)	57,0 ± 0,1 _c	8,3 ± 0,2 _e	48,3 ± 0,1 _e

*Letras iguais nas colunas para o mesmo parâmetro significam que as amostras não diferem significativamente com base no teste de Tukey (p > 0,05).

3.3.8 Capacidade antifúngica

A capacidade antifúngica dos filmes comestíveis à base de gelatina adicionados do OEM foram analisadas para *B. cinerea* e *R. stolonifer*. A escolha dos fungos se deu por serem os maiores

deteriorantes pós-colheita do morango e, de acordo com a literatura, pelo fato do OEM puro apresentar efeito antifúngico contra esses micro-organismos (COMBRINCK, REGNIER E KAMATOU 2011; GUERRA et al., 2015).

O OEM puro apresentou atividade antifúngica contra os fungos estudados, inibindo qualquer crescimento de *B. cinerea* e *R. stolonifer* no tempo de análise, concluindo sua eficácia contra esses dois micro-organismos.

Quanto aos filmes, foi detectado halo de inibição para a formulação A₅ (0,50 %) para os dois fungos estudados, onde o diâmetro encontrado foi de 2,0 cm, exatamente o tamanho do filme utilizado na análise. Foi verificado que o crescimento dos fungos foi desacelerado pela presença do óleo de menta nesses filmes em relação à placa controle, sem filme. Para os filmes controle e adicionados das menores concentrações de óleo de menta, os fungos se desenvolveram sobre toda superfície da placa, inclusive sobre os filmes, não apresentando halo de inibição. Resultados semelhantes foram reportados para filmes de quitosana com óleo essencial de bergamota e os autores explicaram que a disponibilidade do antimicrobiano (óleo) pode ter sido reduzida devido à evaporação progressiva dos voláteis do óleo (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2010)

Para estabelecer as diferentes concentrações de óleo adicionadas nas formulações de cobertura comestível desse estudo, baseou-se em dados encontrados na literatura sobre a concentração mínima inibitória do OEM contra *B. cinerea* e *R. stolonifer*, e também, a partir de estudos preliminares de aderência dessas formulações em frutos de morango. Os resultados para os filmes que não apresentaram atividade contra esses fungos pode estar relacionado devido à volatilização do óleo na etapa de secagem dos filmes ou, também, devido a redução de sua capacidade de inativação quando misturado a outros compostos da matriz filmogênica.

3.4. Conclusão

A partir dos estudos realizados nesse capítulo, foi observado que as coberturas comestíveis à base de gelatina adicionadas de diferentes concentrações do OEM apresentaram aumento da barreira ao vapor de água. A incorporação de maiores concentrações de óleo (0,38 % e 0,50 %) nos filmes afetou as propriedades mecânicas gerando filmes mais frágeis e menos homogêneos em suas superfícies. A distribuição das gotículas de óleo foi homogênea em toda a matriz dos filmes com concentrações de 0,06 %, 0,13 % e 0,25 %. A presença do óleo de menta

influenciou as propriedades dos filmes e levou à alteração da organização molecular da matriz proteica. O óleo de menta nas concentrações adicionadas proporcionou aos filmes de gelatina características hidrofóbicas, tendo pouca interação com a água. Os fungos *B. cinerea* e *R. stolonifer* foram afetados pelo filme contendo 0,50 % do OEM.

Assim, as formulações que apresentaram os melhores resultados em termos de propriedades mecânicas, de barreira e estruturais foram as com menores concentrações de óleo de menta (0,06 %, 0,13 % e 0,25 %). Porém, não obtiveram resultados positivos quanto a capacidade antifúngica.

Sendo assim, estudos adicionais avaliando a melhor incorporação do óleo de menta nos filmes são requeridos.

3.5. Referências Bibliográficas

ABBASZADEH, S.; SHARIFZADEH, A.; SHOKRI, H.; KHOSRAVI, A.R.; ABBASZADEH, A. **Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi.** Journal de Mycologie Médicale. J., v. 24, p. 51 – 56, 2014.

AHMAD, M.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; AGUSTINI, T. W. **Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils.** Food Hydrocolloids. J., v. 28, p. 189-199, 2012.

ALEXANDRE, E. M. C., LOURENÇO, R. V., BITTANTE, A. M. Q. B., MORAES, I. C. F., SOBRAL, P. J. A. **Gelatin-based films reinforced with montmorillonite and activated with nanoemulsion of ginger essential oil for food packaging applications.** Food Packaging and Shelf Life, v. 10, p. 87–96, 2016.

ARFAT, Y.A.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; SUMPAPAPOL, P.; SONGTIPYA, P. **Properties and antimicrobial activity of fish protein isolate/fish skin gelatin film containing basil leaf essential oil and zinc oxide nanoparticles.** Food Hydrocolloids. J., v. 41, p. 265-273, 2014.

ASTM, 2002. **Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. E96-00 Annual Book of American Standard Testing**

Methods, ASTM, Philadelphia, PA (2002).

BAHRAM, S., REZAEI, M., SOLTANI, M., KAMALI, A., OJAGH, S. M., & ABDOLLAHI, M. **Whey protein concentrate edible film activated with cinnamon essential oil. Journal of Food Processing and Preservation. J.**, v. 38, p. 1251-1258, 2014.

BERGO, P.; SOBRAL, P.J.A. **Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin. Food Hydrocolloids. J.**, v. 21, p. 1285-1289, 2007.

BERTAN, L. C.; TANADA-PALMU, P. S.; SIANI, A. C.; GROSSO, C. R. F. **Effect of fatty acids and “Brazilian elemi” on composite films based on gelatin. Food Hydrocolloids**, Tongxiang City, v.19, p.73-82, 2005.

CONBRINCK, S., REGNIER, T., KAMATOU, G. P. P. **In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 344–349, 2011.

COZMUTA, A. M.; TURILA, A.; APJOK, R.; CIOCIAN, A.; COZMUTA, L. M.; PETER, A.; NICULA, C.; GALIC, N.; BENKOVIC, T. **Preparation and characterization of improved gelatin films incorporating hemp and sage oils. Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 144-155, 2015.

DANGARAN, K., TOMASULA, P. M., e QI, P. (2009). **Structure and function of proteinbased edible films and coatings**. In M. E. Embuscado, & K. C. Huber (Eds.), *Edible films and coatings for food applications* (p. 1-23). New York: Springer.

FADINI, A. L.; ROCHA, F. S.; ALVIM, I. D.; SADAHIRA, M. S.; QUEIROZ, M. B.; ALVES, R. M. V.; SILVA, L. B.; **Mechanical properties and water vapor permeability of hydrolyzed collagenecocoa butter edible films plasticized with sucrose. Food Hydrocolloids. J.**, v. 30, p. 625 – 631, 2013.

GAN, Z.; ZHANG, T.; LIU, Y.; WU, D. **Temperature-triggered enzyme immobilization and release based on cross-linked gelatin nanoparticles.** Plos One, J., v. 7, p. e47154, 2012.

GONTARD, N., DUCHEZ, C., CUQ, J. L., GUILBERT, S. **Edible composite films of wheat and lipids: Water vapour permeability and other physical properties.** International Journal of Food Science and Technology, v. 29, p. 39 – 50, 1994.

GUERRA, I. C. D.; OLIVEIRA, P. D. L.; PONTES, A. L. S.; LÚCIO, A. S. S. C.; TAVARES, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MADRUGA, M. S.; SOUZA, E. L. **Coatings comprising chitosan and Mentha piperita L. or Mentha x villosa Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit.** International Journal of Food Microbiology. J., v. 214, p. 168 – 178, 2015.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. **Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils.** Current Medicinal Chemistry. J., v. 10, p. 813 – 829, 2003.

KANMANI, P.; RHIM, J. W. **Physical, mechanical and antimicrobial properties of gelatin based active nanocomposite films containing AgNPs and nanoclay.** Food Hydrocolloids. J., v. 35, p. 644 – 652, 2014.

KAVOOSI, G.; RAHMATOLLAHI, A.; DADFAR, S. M. M.; PURFARD, A. M. **Effects of essential oil on the water binding capacity, physico-mechanical properties, antioxidant and antibacterial activity of gelatin films.** LWT – Food Science and Technology. J., v. 57, p. 556 – 561, 2014.

LIMPISOPHON, K.; TANAKA, M.; OSAKO, K. **Characterisation of gelatin-fatty acid emulsion films based od blue shark (Prionace glauca) skin gelatin.** Food Chemistry. J., v. 122, p. 1095-1101, 2010.

MA, W.; TANG, C.; YIN, S.; YANG, X.; LIU, F.; WEI, Z. **Characterization of gelatin-based edible films incorporated with olive oil.** Food Research Internatinal. J., v. 49, p. 572-579, 2012.

MARTUCCI, J.F.; GENDE, L.B.; NEIRA, L.M.; RUSECKAITE, R.A. **Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films.** *Industrial Crops and Products. J.*, v. 71, p. 205-213, 2015.

OJAGH, S. M., REZAEI, M., RAZAVI, S. H., HOSSEINI, S. M. H. **Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water.** *Food Chemistry*, v. 122, p. 161-166, 2010.

OWENS, D. K.; WENDT, R. C. **Estimation of the Surface Free Energy of Polymers,** *Journal Application of Polymers Science*; v.13, p.1741, 1969.

PERDOMO, J.; COVA, A.; SANDOVAL, A.J.; GARCÍA, L.; LAREDO, E.; MULLER, A.J. **Glass transition temperatures and water sorption isotherms of cassava starch.** *Carbohydrate Polymers. J.*, v. 76, p. 305-313, 2009.

PERDONES, A.; VARGAS, M.; ATARÉS, L.; CHIRALT, A. **Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosanecinnamon leaf oil films as affected by oleic acid.** *Food Hydrocolloids.* v. 36, p.256-264, 2014.

PIRES, C.; RAMOS, C.; TEIXEIRA, G.; BATISTA, R.; NUNES, L.; MARQUES, A. **Characterization of biodegradable films prepared with hake proteins and thyme oil.** *Journal of Food Engineering. J.*, v. 105, p. 422 – 428, 2011.

PIRES, C.; RAMOS, C.; TEIXEIRA, B.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; MARQUES, A. **Hake proteins edible films incorporated with essential oils: Physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties.** *Food Hydrocolloids. J.*, v. 30, p. 224 – 231, 2013.

RAUWENDAAL, C. **Polymer extrusion** (4th ed.). Ohio: Hanser Gardner Publications, Inc., 2001.

ROTTA, J.; OZÓRIO, R.A.; KEHRWALD, A.M.; OLIVEIRA, G.M. de.; AMBONI, R.D.M.C.; BARRETO, P.L.M. **Parameters of color,**

transparency, water solubility, wettability and surface energy of chitosan/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized whit sorbitol. *Materials Science and Engineering C. J.*, v. 29, p. 619-623, 2009.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L., VARGAS, M., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C., CHIRALT, A., E CHÁFER, M. **Use of essential oils in bioactive edible coatings.** *Food Engineering Reviews*, v. 3, p. 1 - 16, 2011.

SOBRAL, P.J.A.; MENEGALLI, F.C.; HUBINGER, M.D.; ROQUES, M.A. **Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films.** *Food Hydrocolloids. J.*, v. 15, p. 423-432, 2001.

SU, J.F.; Huang, Z.; Zhao, Y.H.; Yuan, X.Y.; Wang, X.Y. ; Li, M. **Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films cross linked by Maillard reactions.** *Carbohydrate Polymers. J.*, v. 79, p. 145–153, 2010.

TANG, C.H.; JIANG, Y.; WEN, Q. B.; YANG, X.Q. **Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates.** *Journal of Biotechnology. J.*, v. 120, p. 296 – 307, 2005.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODIPRAN, T. **Structural, morphological and thermal behaviour characterisations of fish gelatin film incorporated with basil and citronella essential oils as affected by surfactants.** *Food Hydrocolloids. J.*, v. 41, p. 33-43, 2014.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODIPRAN, T.; NILSUWAN, K. **Emulsion film based on fish skin gelatin and palm oil: Physical, structural and thermal properties.** *Food Hydrocolloids. J.*, v. 48, p. 248 – 259, 2015.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODIPRAN, T.; PISUCHPEN, S.; OSAKO, K. **Mechanical, thermal and heat sealing properties of fish skin gelatin film containing palm oil and basil essential oil with different surfactants.** *Food Hydrocolloids. J.*, v. 56, p. 93 – 107, 2016.

WU, J.; LIU, H.; GE, S.; WANG, S.; QIN, Z.; CHEN, L.; ZHENG, Q.; LIU, Q.; ZHANG, Q. **The preparation, characterization, antimicrobial stability and in vitro release evaluation of fish gelatin films incorporated whit cinnamon essential oil nanoliposomes.** Food Hydrocolloids. J., v. 43, p. 427-435, 2015.

VANIN, F. N.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C.; CARVALHO, R. A.; HABITANTE, A. M. Q. B. **Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films.** Food Hydrocolloids. J., v. 19, p. 899 – 907, 2005.

VOGLER, E. A. **Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces.** Advances in Colloid and Interface Science, J., v. 74, p. 69–117, 1998.

CAPÍTULO 4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E CAPACIDADE ANTIFÚNGICA DE COBERTURAS COMESTÍVEIS À BASE DE GELATINA ADICIONADAS DE NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE MENTA (*Mentha arvensis*)

Resumo

O óleo essencial de menta (OEM) tem como composto majoritário o mentol, principal responsável pela atividade antimicrobiana desse óleo, no entanto a sua baixa solubilidade em água limita sua utilização. A etapa do trabalho, apresentado neste capítulo, teve como objetivo produzir uma nanoemulsão do óleo essencial de menta (NOEM), incorporá-la nas coberturas comestíveis à base de gelatina (0; 0,06; 0,13; 0,25; 0,38; 0,50 % (g de OEM/g gelatina)) e avaliar a influência desta nas propriedades de barreira, mecânicas, estruturais e capacidade antifúngica do óleo nas coberturas. A emulsão contendo 50 % de OEM mostrou-se estável e de tamanho nanométrico após a etapa de homogeneização em ultrassom e apresentou capacidade antifúngica para *B. cinerea* e *R. stolonifer* quando testada *in vitro*. As diferentes concentrações de NOEM nos filmes obtidos por *casting*, resultaram no aumento da espessura, da opacidade, da resistência ao vapor de água e na diminuição da transparência desses filmes. Além disso, esses filmes apresentaram-se mais elásticos e menos rígidos que o controle. As nanopartículas de óleo tiveram distribuição homogênea na matriz de gelatina. A partir da concentração de 0,25 %, capacidade antifúngica foi apresentada pelos filmes. Os resultados obtidos indicam que a incorporação do óleo de menta na forma de NOEM em coberturas comestíveis de gelatina, além de servir como um conservante natural pode ser promissora para o aumento da vida útil de frutas.

4.1 Introdução

O avanço nos estudos sobre coberturas e filmes comestíveis com propriedades antimicrobianas naturais tem crescido consideravelmente nos últimos anos. Entretanto, ainda é um desafio cada vez maior para os pesquisadores na área de alimentos devido à reduzida capacidade de migração dos compostos ativos da cobertura para o alimento. Os óleos essenciais são reconhecidos como seguros para a saúde e diversas

pesquisas relatam sua atividade contra o crescimento de microorganismos em alimentos. Porém, sua introdução direta nas formulações de polímeros enfrenta desafios como perda de atividade e coalescência (BORGES et al., 2013; VU et al., 2011; TONGNUANCHAN, BENJAKUL e PRODIPRAN, 2013).

O óleo essencial de menta tem como composto principal o mentol, que pode variar em sua concentração dependendo de fatores ambientais, cultura, condições de armazenamento, entre outros. O mentol é o principal responsável pela atividade antimicrobiana desse óleo (TIWARI, 2016). Em geral, o óleo essencial de menta contém 47 % de mentol, apresenta atividade para inibir 100 % do crescimento do fungo *Botrytis cinerea* na concentração mais baixa de 3,0 µL/mL conforme estudo de Combrinck, Regnier e Kamatou (2011). Essa atividade foi testada do óleo diretamente em contato com o fungo.

As nanoemulsões, normalmente, apresentam tamanhos de gota entre 10 a 500 nm, são muitas vezes estáveis por um longo período de tempo, necessitam de baixas concentrações de tensoativos e são formadas utilizando baixa ou alta energia de emulsificação (MCCLEMENTS, 2011; DONSI e FERRARI, 2016). A incorporação de nanoemulsões de óleos essenciais em filmes e coberturas comestíveis para alimentos tem potencialidade em relação à atividade antimicrobiana e propriedades físico-químicas. Porém ainda são poucos os estudos sobre essa aplicação (OTONI et al., 2014; SEVERINO et al., 2014; SEVERINO et al., 2015; ALEXANDRE et al., 2016; GAHRUIE et al., 2017). Quanto menor as partículas das nanoemulsões de óleos essenciais incorporadas na matriz filmogênica, melhor são as propriedades físico-químicas, de estabilidade, atividade antimicrobiana e possibilidade de redução na concentração do óleo (MCCLEMENTS e RAO, 2011).

Alexandre et al. (2016), por exemplo, relataram melhorias nas propriedades de barreira, mecânicas, cristalinidade e efeito antioxidante. Porém, não obtiveram atividade antimicrobiana em filmes de gelatina com nanoemulsões de montmorilonita e óleos essenciais de gengibre.

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e estudo da influência de nanoemulsão de óleo essencial de menta (*Mentha arvensis*), com 40 % de mentol, adicionada em coberturas comestíveis à base de gelatina com a finalidade de avaliar as propriedades de barreira, mecânicas, estruturais e propriedades antifúngicas da cobertura para *Botrytis cinerea* e *Rizopus stolonifer*.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material

Os materiais utilizados foram os mesmo descritos no capítulo 3, item 3.2.1.

4.2.1 Preparo da nanoemulsão do óleo essencial de menta

O método para o preparo da NOEM seguiu estudo de Meneses (2016) e Gahrue et al. (2017), com algumas modificações. Foi preparada uma mistura de solução aquosa de Tween 80 (6 % m/m) sob agitação a 500 rpm por 10 min. O óleo (50 % m/m) foi adicionado na fase aquosa agitando-se por mais 15 min. A emulsão obtida foi sonicada por 3 min com amplitude de 50 % (pulso de 30 s e descanso de 10 s) utilizando um homogeneizador ultrassônico (Fisher Scientific, Ultrasonic Dismembrator Model 500, 400 W, Hampton, New Hampshire, United States). A emulsão foi mantida em banho de gelo, ± 10 °C, durante todo o processo. A NOEM obtida foi utilizada logo após seu preparo.

4.2.2 Caracterização da nanoemulsão

4.2.2.1 Tamanho de Partícula, Polidispersão, Potencial Zeta e Capacidade antifúngica

A NOEM produzida foi analisada logo após sua formação com leituras em triplicata. O tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta foram medidos utilizando um difratômetro de laser Zetasizer Nano ZS 3600 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido). A NOEM foi dispersa com água destilada a uma concentração 1:10 para evitar múltiplos efeitos de dispersão, em uma cubeta própria para análise à 25 °C. O tamanho de partícula foi medido por espalhamento dinâmico de luz (ACEVEDO-FANI *et al.*, 2015).

A capacidade antifúngica da NOEM seguiu metodologia descrita no capítulo 3, item 3.2.3.10.

4.2.3 Preparo das coberturas comestíveis com NOEM

A solução da cobertura filmogênica à base de gelatina seguiu o mesmo método de preparo do item 3.2.2, porém sem adição do óleo essencial. Foram incorporadas diferentes concentrações de NOEM (0, 0,06; 0,13, 0,25; 0,38; 0,50 (g OEM/g gelatina)) na solução filmogênica resfriada à 27 °C. As soluções adicionadas da nanoemulsão foram então homogeneizadas em um Ultra-Turrax T25 IKA-Werke (Steufen, Germany) à 14.500 rpm por 3 min. As bolhas foram retiradas sob vácuo. Para a formação dos filmes, 20 g de solução foram colocadas em placas de acrílico de 15 cm de diâmetro e armazenadas à 25 °C por 24 h para secagem. Os filmes formados foram retirados das placas, cortados e armazenados a 58 % UR à 25 °C por 48 h até a realização das análises, exceto para ensaio antifúngico, onde os filmes foram utilizados logo após a secagem. O método de preparo foi como descrito por Tongnuanchan et al. (2015).

4.2.4 Caracterização das coberturas comestíveis com NOEM

As caracterizações das coberturas na forma de filmes foram as mesmas realizadas no capítulo 3 e descritas no item 3.2.3.

4.2.5 Análises Estatísticas

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) usando *software* Statistica 10 (Stafsoft Inc., EUA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Caracterização da nanoemulsão: Tamanho de Partícula, Polidispersão, Potencial Zeta e Capacidade antifúngica da NOEM

A nanoemulsão do óleo de menta foi caracterizada logo após seu preparo e os resultados para tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta estão descritos na Tabela 4.1. Visualmente a NOEM apresentou estabilidade física, sem separação de fases, e de aspecto leitosa e esbranquiçada, característico de nanoemulsões.

O tamanho de partícula foi de 219,3 nm, dentro da escala nanométrica, indicando, dessa forma, a estabilidade da nanoemulsão. O índice de polidispersão (PDI) é uma medida que representa a homogeneidade na distribuição das partículas, variando de 0 (monodisperso - homogêneo) a 1,0 (distribuição ampla - heterogêneo) (CHEONG et al., 2008; ACEVEDO-FANI et al., 2015). O valor do PDI foi de 0,122 e corroborou com os valores do tamanho de partícula, indicando boa distribuição das gotas de óleo na emulsão.

Em relação ao Potencial Zeta, que é empregado para indicar o comportamento da estabilidade de uma dispersão (prevendo uma suspensão estável quando valores acima de + 30 ou inferiores a - 30 mV) (PÉREZ CÓRDOBA e SOBRAL, 2017) o valor encontrado foi de - 40 mV, indicando que a emulsão manteve-se estável.

Tabela 4.1 – Tamanho de Partícula, Índice de Polidispersão (PDI) e Potencial Zeta da nanoemulsão do óleo essencial de menta.

NOEM (% OEM)	Tamanho de Partícula (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
50	219 ± 0,6	0,122 ± 0,0	- 40 ± 0,6

A acapacidade antifúngica da nanoemulsão do óleo de menta foi determinada para *B. cinerea* e *R. stolonifer* usando a técnica de difusão em disco. A nanoemulsão foi capaz de inibir qualquer crescimento dos fungos estudados, indicando a potencial atividade antifúngica do óleo, mesmo estando misturado a outros componentes. Gahuie et al. (2017) confirmaram atividade antimicrobiana para *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* pela nanoemulsão do óleo de *Zataria multiflora*, obtida por sonicação, para posterior aplicação em filmes à base de goma da semente de manjeriço.

4.3.2 Espessura, Transparência e Opacidade

Na Tabela 4.2 estão descritos os efeitos da adição da NOEM sobre nas propriedades de espessura, transparência, opacidade e PVA dos filmes.

A espessura dos filmes variou de 36,2 a 42,6 μm permanecendo constante até a formulação N₃ (0,25 %). Observou-se efeito significativo ($p < 0,05$) a partir da formulação N₄ (0,38 %). Esse aumento pode estar relacionado ao maior teor de sólidos adicionados nessas formulações. Ma et al. (2015) relataram que a incorporação de maiores concentrações de microemulsões de óleo essencial de canela aumentaram as espessuras dos filmes à base de quitosana. O oposto foi observado por Ghani et al. (2018), em que as espessuras dos filmes à base de proteína de soja não aumentaram com a adição de diferentes concentrações de nanoemulsão do óleo essencial de canela

A incorporação das diferentes concentrações de NOEM nos filmes de gelatina reduziu a transparência somente das amostras N₄ e N₅, em relação ao filme controle. Isto pode ter ocorrido devido a maior concentração de óleo de menta e emulsificante nessas formulações (GHANI et al. 2018; GAHADETAJ et al., 2018). Enquanto que, as amostras N₁, N₂ e N₃ não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) na aparência dos filmes em relação ao filme controle.

Com relação à opacidade dos filmes com NOEM, variando de 11,9 a 15,1, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) a partir da formulação N₃ em comparação ao filme controle. Segundo Ma et al. (2016) o aumento no teor de óleo de canela podem ter influenciado no aumento da opacidade dos filmes de quitosana. Então, o mesmo pode ter acontecido com a opacidade dos filmes do presente estudo, onde o aumento nas concentrações de NOEM aumentou a opacidade dos filmes de gelatina.

Em comparação com os resultados obtidos para amostras adicionadas de óleo de menta puro (Capítulo 3), foi possível observar que as espessuras (36,2 - 42,6 μm) e transparências (83,0 – 80,0 %) dos filmes adicionados de diferentes concentrações da NOEM tiveram pouca variação com relação ao controle, do que os resultados dos filmes adicionados do OEM, que variaram de 41 a 44 μm para espessura e 82 a 76,3 % para transparência, comparados ao controle. Os resultados da opacidade dos filmes foram menores com a adição de NOEM (11,9 a 15,1 %) em relação aos filmes adicionados do OEM (13,0 a 18,0 %). Esses resultados sugerem que, a técnica de nanoemulsão de óleos essenciais proporciona redução do tamanho de partícula e melhor distribuição delas na matriz dos filmes à base de gelatina, quando comparados à produção convencional de filmes de gelatina adicionados de OEM, utilizando a técnica de emulsão por equipamento ultratúrrax.

Vale ressaltar que, a técnica de nanoemulsão do óleo de menta utilizou baixa concentração de emulsificante para obter uma emulsão de 50 % de óleo estável. Com isso, a quantidade de emulsificante Tween 80 foi menor para as formulações de filmes com NOEM, comparado com as formulações de filmes com OEM do capítulo 3. Isso, também, pode ter influenciado nos resultados de espessura, transparência e opacidade do presente capítulo.

4.3.3 Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)

A PVA dos filmes de gelatina adicionados de diferentes concentrações de NOEM variou de 1,09 a $1,19 \times 10^{-4}$ g.mm/m².Pa.h, e estão descritos na Tabela 4.2. Houve redução significativa ($p < 0,05$) da PVA para todos os filmes adicionados de NOEM em comparação ao filme controle. Como esperado, a dispersão do óleo de menta na forma de nanoemulsão na matriz de gelatina dos filmes aumentou a tortuosidade do sistema, reduzindo a PVA (ALEXANDRE et al., 2016). Entretanto, as diferentes concentrações de NOEM nos filmes não diferiram entre si nos valores da PVA. Em estudos realizados por Ghani et al. (2018), com filmes de polissacarídeo de soja adicionados de diferentes concentrações de nanoemulsão de óleo essencial de canela, eles relataram que a PVA dos filmes foram reduzidas significativamente com as maiores concentrações de nanoemulsão do óleo em relação ao filme controle. Uma das explicações dos autores, é que provavelmente a incorporação da nanoemulsão aumentou o caráter hidrofóbico dos filmes e que a forte ligação entre o polímero e as gotas da nanoemulsão do óleo reduziram as forças de agregação entre cadeias do polissacarídeo.

Alexandre et al. (2016), não observaram diferença na PVA de filme de gelatina adicionado com nanoemulsão de óleo essencial de gengibre em relação ao filme controle. Os autores explicaram que a transferência de massa ocorre através da fase contínua (gelatina-glicerol), e que esta ocupou a maior parte do filme. A menor parte, ocupada pelas gotículas do óleo, não foi capaz de reduzir significativamente a taxa de transferência ao vapor de água do filme.

A PVA é uma característica importante para alimentos. A adição da NOEM nos filmes reduziu os valores da PVA (1,09 a $1,19 \times 10^{-4}$ g.mm/m².Pa.h), indicando boa distribuição do óleo na matriz de gelatina, até mesmo nos filmes de maiores concentrações. Enquanto que, os valores das PVA dos filmes com maiores concentrações de OEM não

apresentaram diferenças com o filme controle, mostrando que o óleo incorporado diretamente nas soluções de cobertura não proporcionou distribuição homogênea na matriz desses filmes.

Tabela 4.2 – Espessura, Transparência, Opacidade e PVA dos filmes de gelatina incorporados com nanoemulsão do óleo essencial de menta (NOEM) em diferentes concentrações.

Formulações (% OEM)	Espessura (μm)	Transparência (%)	Opacidade (%)	PVA ($\times 10^{-4}$ $\text{g}\cdot\text{mm}/\text{m}^2\cdot\text{Pa}\cdot\text{h}$)
Controle (0)	$37,0 \pm 4,0$ ab	$83,3 \pm 1,0$ a	$11,0 \pm 1,0$ a	$1,55 \pm 0,02$ a
N ₁ (0,06)	$36,2 \pm 1,5$ a	$83,0 \pm 1,0$ ab	$11,9 \pm 1,0$ ab	$1,09 \pm 0,02$ b
N ₂ (0,13)	$38,2 \pm 1,4$ ab	$82,5 \pm 1,0$ ab	$12,1 \pm 1,0$ ab	$1,13 \pm 0,01$ b
N ₃ (0,25)	$39,2 \pm 1,6$ b	$82,1 \pm 1,0$ ab	$13,2 \pm 1,0$ bc	$1,10 \pm 0,02$ b
N ₄ (0,38)	$42,1 \pm 2,1$ c	$81,6 \pm 1,0$ b	$14,4 \pm 1,0$ cd	$1,19 \pm 0,01$ b
N ₅ (0,50)	$42,6 \pm 1,3$ c	$80,0 \pm 1,1$ c	$15,1 \pm 1,0$ d	$1,19 \pm 0,03$ b

*Letras iguais nas colunas para o mesmo parâmetro significam que as amostras não diferem significativamente com base no teste de Tukey ($p > 0,05$).

4.3.4 Propriedades Mecânicas

Os filmes adicionados das diferentes concentrações de NOEM foram avaliados quanto a tensão de ruptura, alongação e módulo de Young, e os resultados estão representados na Tabela 4.3. Os valores da tensão de ruptura dos filmes contendo NOEM foram menores significativamente ($p < 0,05$) quando comparados ao filme controle, e variaram de 33,0 a 25,2 MPa. O oposto foi encontrado para os valores de alongação dos filmes com NOEM, que aumentaram de 22,0 a 27,0 % e significativamente diferentes ($p < 0,05$) do filme puro de gelatina. Esse comportamento é característico de filmes plastificados, e o aumento da tensão de ruptura e a redução da alongação mostram que o óleo de menta presente na matriz de gelatina atuou como agente plastificante, além da ação do glicerol (PÉREZ-CÓRDOBA et al., 2018).

O módulo de Young mostra o quanto um material é rígido ou não. O maior valor encontrado foi de 1596,0 MPa para o filme puro de gelatina, caracterizando, nesse estudo, como o filme mais rígido e menos maleável. Quando a NOEM foi adicionado aos filmes, os valores para módulo de Young diminuíram significativamente ($p < 0,05$), conforme o aumento da concentração do óleo nas formulações, variando de 1034,0 a 855,2 MPa. Entretanto, esse comportamento não foi linear, de acordo com os resultados obtidos para o revestimento nominado N₅ com maior concentração de emulsão. Aparerentemente, há um limite para uma boa distribuição do óleo na matriz de gelatina, uma vez que o aumento de 0,50 % não foi capaz de diminuir a tensão de ruptura e módulo de Young e de aumentar a elongação, como o esperado. De acordo com Ma et al. (2016), o conteúdo de óleo mais alto no filme pode ter diminuído a homogeneidade da estrutura da matriz de gelatina, deixando parte do óleo livre à rede, e dessa forma, não sendo capaz de melhorar qualquer uma das propriedades.

Os resultados das propriedades mecânicas do presente estudo estão de acordo com os obtidos no capítulo 3 e os relatados por Ma et al. (2016) e Pérez-Córdoba et la. (2018) para filmes de quitosana e microemulsão de óleo de canela e óleo de soja, e para filmes de gelatina-quitosana adicionados de nanoemulsões de óleo de canola carregadas de atocoferyl e óleo de alho, respectivamente. Já o oposto foi relatado por Alexandre et al. (2016), para filmes à base de gelatina adicionados de nanoemulsão de óleo essencial de gengibre, onde descreveram que a tensão de ruptura e módulo de Young dos filmes aumentaram e a elongação diminuiu devido à adição do óleo. Assim, as propriedades mecânicas dos filmes é fortemente dependente das particularidades de cada óleo e das interações deste com a matriz polimérica. No presente trabalho, a incorporação do óleo de menta na forma de nanoemulsão teve efeito significativo nas propriedades mecânicas dos filmes à base de gelatina.

Tabela 4.3 – Tensão de ruptura, alongação e módulo de Young dos filmes de gelatina incorporados com nanoemulsão do óleo essencial de menta (NOEM) em diferentes concentrações.

Formulações (% OEM)	Tensão de Ruptura (MPa)	Elongação (%)	Módulo de Young (MPa)
Controle (0)	41,0 ± 2,0 _a	13,3 ± 2,2 _a	1596,0 ± 60,2 _a
N ₁ (0,06)	33,0 ± 2,0 _b	22,0 ± 2,4 _b	1034,0 ± 80,0 _b
N ₂ (0,13)	29,0 ± 3,0 _c	24,2 ± 2,2 _{bc}	924,1 ± 70,0 _{bc}
N ₃ (0,25)	27,0 ± 2,2 _c	26,0 ± 2,2 _{bc}	915,0 ± 86,3 _{bc}
N ₄ (0,38)	25,2 ± 2,0 _c	27,0 ± 2,0 _c	855,2 ± 95,0 _c
N ₅ (0,50)	25,2 ± 2,2 _c	26,0 ± 2,0 _{bc}	877,0 ± 97,0 _c

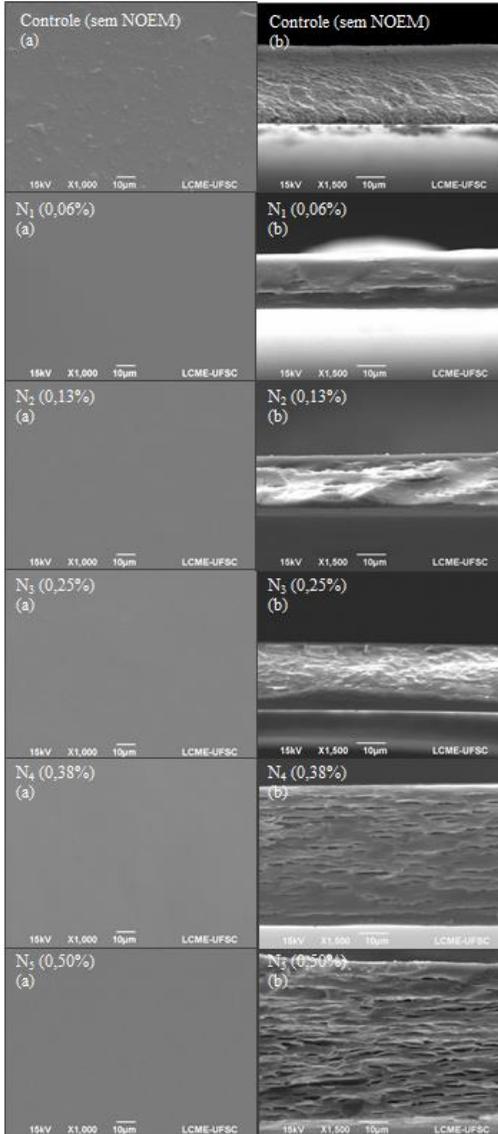
*Letras iguais nas colunas para o mesmo parâmetro significam que as amostras não diferem significativamente com base no teste de Tukey ($p > 0,05$).

4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na Figura 4.1 estão apresentadas as micrografias dos filmes obtidas por MEV. O filme controle mostrou uma superfície lisa, com presença de particulados, podendo ser pequenas bolhas de ar que não foram completamente removidas após etapa de vácuo. A fratura do filme controle foi compacta e pouco áspera, apresentando homogeneidade. Filmes adicionados das diferentes concentrações de NOEM, apresentaram superfície lisas, homogêneas, sem particulados e nenhuma coalescência do óleo foi visualizada. Nas fraturas dos filmes N₁, N₂ e N₃, as imagens mostram uma estrutura mais compacta e menos áspera, comparado ao filme controle, podendo indicar boa incorporação e alta compatibilidade dessas concentrações de NOEM na matriz desses filmes. Para as formulações N₄ e N₅, foi possível observar a presença mais acentuada da NOEM na matriz de gelatina, sendo mais evidente para 0,50 % (N₅), porém homogênea nas duas formulações. O aumento da concentração poderia acarretar em coalescência da nanoemulsão durante a secagem dos filmes, e causar estrutura mais desordenada e descontínua, como ocorreu para os filmes com OEM no Capítulo 3, porém a NOEM, além de diminuir o tamanho das partículas de óleo, se mostrou estável após incorporação nos filmes de gelatina.

Correlacionando os resultados da PVA e das propriedades mecânicas, dos filmes adicionados de NOEM, com as micrografias, observa-se que a nanoemulsão, melhorou a distribuição e a compatibilidade do óleo na matriz de gelatina, dificultando dessa forma a transferência dos vapores de água através dos filmes e aumentando suas elasticidades.

Figura 4.1 – Microscopia eletrônica de varredura dos filmes de gelatina incorporados com nanoemulsão do óleo essencial de menta (NOEM) em diferentes concentrações. Superfície superior (a) e Fratura transversal (b).



Fonte: Autor.

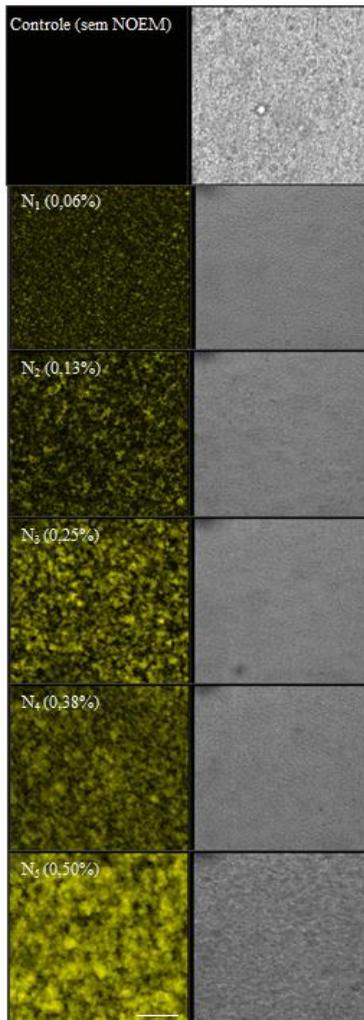
4.3.6 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

A distribuição da NOEM (amarelo) na matriz de gelatina dos filmes (preto) foi possível ser visualizada com a análise de MCVL. As microscopias estão apresentadas através da Figura 4.2. Como o filme controle não teve adição de NOEM demarcada com corante vermelho do Nilo, não é possível observar nenhuma fluorescência na imagem. Pelas MCVL das amostras adicionadas das diferentes concentrações de NOEM foi observado um aumento na quantidades de gotas com o aumento da concentração de nanoemulsão. A distribuição das partículas de NOEM na matriz dos filmes foi homogênea por toda a área de filme, sem espaços vazios ou aglomerados lipídicos, indicando boa distribuição do óleo de menta na matriz de gelatina após a etapa de secagem. Isso indica que a quantidade de emulsificante utilizada no preparo da nanoemulsão foi suficiente para reduzir os tamanhos das partículas de óleo de menta e estabilizá-las na matriz dos filmes para cada formulação.

Tongnuanchan et al. (2015) utilizaram a mesma técnica de MCVL para visualizar a distribuição do óleo de palma em filmes de gelatina de pele de peixe. Relataram a partir da técnica, uma boa distribuição e homogeneidade do óleo de palma nos filmes de gelatina, mesmo nas mais altas concentrações. No estudo, utilizaram lecitina de soja como emulsificante e ultraturrax como dispersor.

Podemos observar que o efeito dos lipídeos na matriz de filmes à base de gelatina é dependente da particularidade de cada óleo e de como os filmes são desenvolvidos. A técnica de MCVL proporcionou tanto no capítulo 3, como neste capítulo, a visualização da distribuição das gotas de óleo de menta na matriz de gelatina dos filmes, e mostrou que a produção de NOEM reduziu visualmente o tamanho das partículas de óleo e melhorou a sua distribuição na matriz dos filmes, quando comparado à adição direta do OEM nos filmes, apresentado no capítulo 3.

Figura 4.2 – Microscopia confocal de varredura a laser dos filmes de gelatina incorporados com nanoemulsão do óleo essencial de menta (NOEM) em diferentes concentrações. Barra indicativa de tamanho representa 25 μm .



Fonte: Autor.

4.3.7 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Na Figura 4.3 estão apresentados os espectros de FTIR dos filmes de gelatina incorporados com diferentes concentrações de NOEM. A

partir da análise dos espectros de FTIR pode-se verificar, a nível molecular, mudanças de grupos funcionais ou mudanças estruturais das amostras de filmes. Assim, foi possível avaliar as interações entre o óleo de menta e a matriz da gelatina. Todos os espectros dos filmes à base de gelatina foram semelhantes e apresentaram picos consideráveis na região amida, com pequenas diferenças nas amplitudes dos picos, dependendo da concentração de óleo de menta incorporado. Os espectros estão de acordo com os relatados no capítulo 3 (quando óleo puro foi adicionado), e também de acordo com apresentado por Ahmad et al. (2012), Tongnuanchan et al. (2015) e Dammak et al. (2017) para filmes de gelatina adicionados de uma fração lipídica. As menores bandas de número de onda 1042 cm^{-1} , correspondendo a grupos OH (glicerol), foram encontradas para todos os filme. Foi constatado que a amplitude desses picos aumentaram com o aumento na concentração de NOEM, não apresentando diluição do plastificante pelo óleo de menta (TONGNUANCHAN et al., 2015).

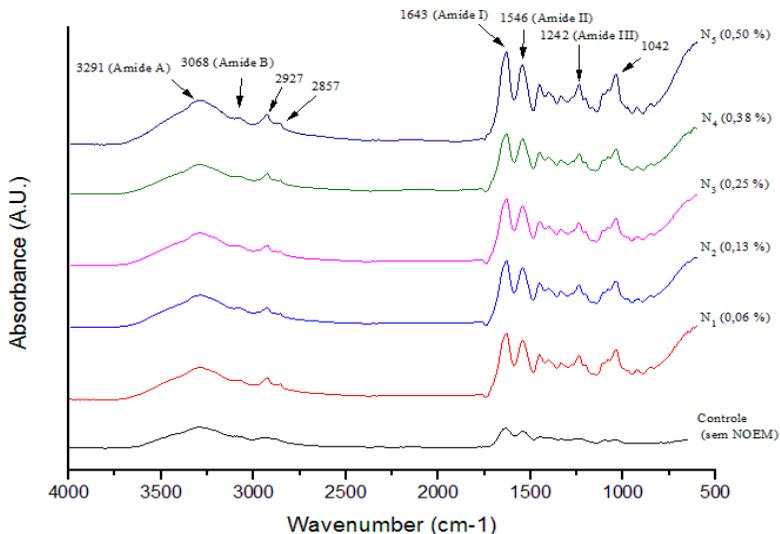
Para os filmes adicionados de NOEM, observou-se um aumento nas amplitudes das bandas relacionadas às Amidas I (1643 cm^{-1}), II (1546 cm^{-1}) e III (1242 cm^{-1}), em relação ao filme controle. A Amida I é atribuída à ligações C=O/ligação hidrogênio acoplado a C-N e deformação CCN, para a Amida II são atribuídas às vibrações de flexão de grupos N-H e vibração de alongamento C-N e a Amida III as vibrações de grupos C-N e N-H das ligações amida ou vibrações de CH_2 de grupos prolina e glicina de moléculas de gelatina. Os resultados sugerem que a nanoemulsão possa ter enfraquecido as interações intermoleculares entre os componentes dos filmes, correlacionando, desta forma, a redução dos valores da tensão de ruptura e aumento da elasticidade dos filmes adicionados de NOEM (AHMAD et al., 2012; TONGNUANCHAN et al., 2015; DAMMAK et al., 2017).

A amplitude das bandas de números de ondas 2927 cm^{-1} e 2857 cm^{-1} são maiores para os filmes incorporados das diferentes concentrações de NOEM. Essas bandas representam as vibrações de alongamento assimétricas e simétricas do tipo alifáticos C-H em grupos CH_2 e CH_3 , e indicam a presença de hidrocarbonetos, os quais vibram nessas regiões, podendo modificar a organização molecular e interação intermolecular na matriz desses filmes. O aumento da amplitude dessas bandas foi maior quanto maior a concentração de NOEM incorporada aos filmes. Resultados que corroboram com os encontrados por Wu et al. (2015) para filmes de gelatina de peixe incorporados com nanolipossomas de óleo essencial de canela.

As bandas de números de ondas 3291 cm^{-1} e 3068 cm^{-1} são referentes à Amida A e Amida B, respectivamente, e foram observadas em todas as amostras de filmes à base de gelatina. As diferentes concentrações de NOEM incorporadas nos filmes não alteraram os valores dos números de onda das bandas. Com relação a Amida A, ela corresponde à vibrações de alongamento do grupo NH- e ligações de hidrogênio e a Amida B às vibrações de alongamento CH (TONGNUANCHAN et al., 2015; DAMMAK et al., 2017). As alturas das bandas dos espectros são proporcionais às concentrações de NOEM nos filmes. Com isso, a adição de NOEM modificou a organização molecular e interação intermolecular na matriz de gelatina do filmes.

Como esperado, os resultados da análise de FTIR dos filmes com NOEM, do presente trabalho, foram próximos, ou podendo-se dizer iguais, que os encontrados para os filmes com adição de OEM, na forma original, uma vez que manteve-se a mesma formulação, modificando apenas a forma de adição da fração lipídica. Apenas mudanças não significativas foram feitas na concentração de tween 80.

Figura 4.3 – Espectros de infravermelho dos filmes de gelatina incorporados com nanoemulsão do óleo essencial de menta (NOEM) em diferentes concentrações.



Fonte: Autor.

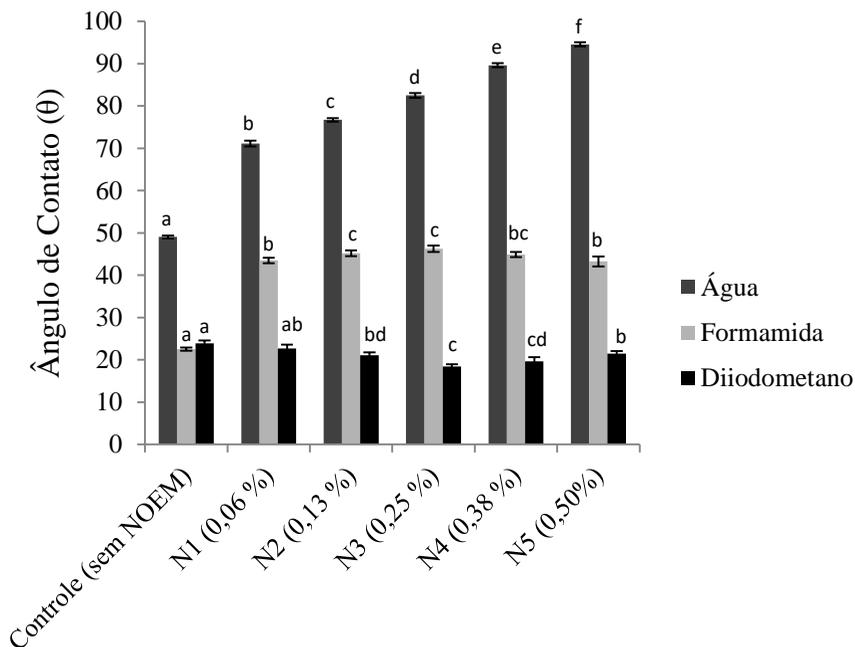
4.3.8 Ângulo de Contato e Energia Livre Superficial

O valor do ângulo de contato com a água sobre uma superfície pode ser usado como um indicador de hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade dessa superfície. Se após deposição de uma gota de água sobre uma superfície o ângulo gerado for maior que 65° , a superfície pode ser considerada como hidrofóbica, logo, se o ângulo for menor que 65° , a superfície pode ser considerada hidrofílica (VOGLER, 1998; ROCCA-SMITH, et al. 2016).

Na Figura 4.4 estão representados os valores dos ângulos de contato dos líquidos padrões (água, formamida e diiodometano) sobre as superfícies dos filmes adicionados das diferentes concentrações da NOEM. Apesar da natureza hidrofílica da gelatina e do glicerol, observa-se um aumento significativo ($p < 0,05$) do ângulo de contato entre a água e os filmes adicionados de NOEM quando comparados ao filme controle. Quanto maior a concentração de nanoemulsão, maior o valor do ângulo de contato da água sobre os filmes, variando de 71 a 95° . Portanto, é evidente o aumento do ângulo de contato dos filmes com a incorporação de maiores concentrações de um agente hidrofóbico, no caso a NOEM, levando ao desenvolvimento de filmes mais hidrofóbicos. Esses resultados estão de acordo com os encontrados no capítulo 3, para os filmes de gelatina adicionados de OEM, com os obtidos por Pérez-Cordoba e Sobral (2017), para filmes de gelatina, quitosana e caseinato de sódio incorporados com compostos ativos nanoemulsionados e os obtidos por Kim, Song-Ee e Bin (2018), para filmes de gelatina de peixe incorporados com óleo essencial de canela.

Outro fator importante é com relação à homogeneidade da superfície dos filmes, pois quando a superfície do filme é lisa e homogênea, a dificuldade deste em absorver água é maior comparado a superfícies mais rugosas e heterogêneas. As superfícies dos filmes observadas pelas micrografias indicaram filmes mais lisos e homogêneos para os adicionados de NOEM do que o controle, o que corrobora com os resultados dos ângulos de contato do presente estudo.

Figura 4.4 – Ângulos de contato dos líquidos padrões água, formamida e diiodometano sobre os filmes de gelatina incorporados com nanoemulsão do óleo essencial de menta (NOEM) em diferentes concentrações



Fonte: Autor.

*Letras iguais nas colunas para o mesmo parâmetro significam que as amostras não diferem significativamente com base no teste de Tukey ($p > 0,05$).

Para entender melhor sobre o efeito da adição das diferentes concentrações de NOEM nos filmes, a energia livre superficial e suas componentes polar e dispersiva foram determinadas (Tabela 4.4). Através dos ângulos de contato dos três líquidos padrões sobre os filmes foram obtidos os resultados da energia livre superficial e suas componentes polar e dispersiva. As componentes polares dos filmes adicionados das diferentes concentrações de NOEM apresentaram valores menores ($p < 0,05$) com relação ao controle. Enquanto que, as componentes dispersivas foram maiores. Com essa diferença, podemos constatar que a adição de NOEM nos filmes aumentou seu caráter hidrofóbico, pois quando a energia livre superficial polar é menor que a energia livre superficial dispersiva, essa superfície pode ser considerada hidrofóbica (COZMUTA

et al., 2015; BENBETAIEB et al., 2016). Isso é resultante dos altos valores dos ângulos de contato da água sobre os filmes com NOEM, não facilitando a dispersão do líquido sobre a superfície do filme, oposto aos ângulos da formamida e diiodometano sobre os filmes, que foram menores, e com isso gerando a redução da energia livre superficial dos filmes adicionados da NOEM.

A partir desses resultados, pode-se afirmar que houve um aumento do caráter hidrofóbico dos filmes adicionados de NOEM (71 a 95 ° do ângulo da água) comparados aos filmes adicionados do OEM (49 a 63,1 ° do ângulo da água) estudados anteriormente. A redução do tamanho das partículas do óleo de menta pela técnica de nanoemulsão melhorou a distribuição do óleo na matriz de gelatina, fazendo com que os filmes fossem mais homogêneos e com menor afinidade pela água.

Tabela 4.4 – Energia livre superficial, componente polar e componente dispersiva dos ângulos de contato sobre os filmes de gelatina incorporados com nanoemulsão do óleo essencial de menta (NOEM) em diferentes concentrações.

Formulações (% OEM)	Energia Livre Superficial (mN.m ⁻¹)	Componente Polar (mN.m ⁻¹)	Componente Dispersiva (mN.m ⁻¹)
Control (0)	59,2 ± 0,3 _a	17,0 ± 0,1 _a	43,0 ± 0,2 _a
N ₁ (0,06)	50,0 ± 0,3 _b	3,0 ± 0,2 _b	47,0 ± 0,3 _b
N ₂ (0,13)	50,0 ± 0,2 _b	2,2 ± 0,2 _c	47,4 ± 0,2 _{cc}
N ₃ (0,25)	50,0 ± 0,2 _b	2,0 ± 0,1 _d	48,2 ± 0,1 _d
N ₄ (0,38)	50,0 ± 0,1 _b	2,1 ± 0,2 _{cd}	48,0 ± 0,3 _{de}
N ₅ (0,50)	50,0 ± 0,4 _b	3,0 ± 0,3 _b	47,3 ± 0,2 _{bc}

*Letras iguais nas colunas para o mesmo parâmetro significam que as amostras não diferem significativamente com base no teste de Tukey (p > 0,05).

4.3.9 Capacidade Antifúngica

Todos os filmes foram caracterizados quanto a sua capacidade para inibir o crescimento de *B. cinerea* e *R. stolonifer*. O método de

difusão em disco, descrito na etapa 3.2.3.11, mostrou ser uma técnica capaz de indicar se os filmes possuíam alguma capacidade antifúngica.

Com relação ao filme controle houve crescimento dos fungos sobre os filmes, não apresentando halo de inibição e nem reduzindo o desenvolvimento dos fungos durante o tempo analisado. Para os filmes adicionados da NOEM, foi possível observar redução no desenvolvimento dos dois fungos, para as maiores concentrações de NOEM nos filmes. Para as amostras de filmes N_1 e N_2 não apresentaram halo de inibição para *B. cinerea* e *R. stolonifer*, e os fungos se desenvolveram sobre a superfície desses filmes. As concentrações de 0,06 e 0,13 % do óleo nas formulações dos filmes não foram suficientes para inibir o desenvolvimento de 10^5 esporos/ml dos fungos estudados. Para as formulações N_3 , N_4 e N_5 , a redução do desenvolvimento dos fungos para o tempo analisado foi mais pronunciada, sendo possível observar halo de 2,0 cm de diâmetro, exatamente o tamanho dos filmes sobrepostos nas placas, mostrando que os fungos não se desenvolveram sobre essas superfícies. Assim, a capacidade antifúngica para *B. cinerea* e *R. stolonifer* foram dos filmes contendo 0,25 %, 0,38 % e 0,50 % de óleo de menta em nanoemulsão.

Otoni et al. (2014) mostraram que a incorporação de gotículas menores de cinamaldeído nos filmes à base de pectina e puré de mamão, apresentaram aumento das propriedades antimicrobianas, indicadas por halos de inibição. Ainda explicaram que a atividade antimicrobiana melhorada pelas gotículas menores podem ser atribuídas a uma maior capacidade do composto ativo para migrar do filme para as células microbianas.

Com isso, pode-se dizer que a NOEM aumentou a disponibilidade do óleo nos filmes de maior concentração, pela redução do tamanho de partícula, e com isso, também pode ter reduzido sua volatilidade durante a etapa de secagem e de análise. Resultado diferenciado para os filmes adicionados de OEM (Capítulo 3), utilizando técnica de emulsão convencional das soluções para os filmes A_3 (0,25 %) e A_4 (0,38 %), adicionados das mesmas concentrações de OEM.

4.4 Conclusão

A sonicação promoveu a redução do tamanho das gotas do óleo de menta em escala manométrica (219 nm) e garantiu estabilidade física da emulsão. A mistura entre os componentes da nanoemulsão não

interferiu na capacidade antifúngica do óleo essencial de menta, sendo observado atividade antifúngica da NOEM para *B. cinerea* e *R. stolonifer*.

Quando a NOEM foi incorporada em diferentes concentrações nos filmes à base de gelatina, esta promoveu o aumento da espessura, redução da transparência e aumento da opacidade dos filmes. A incorporação das concentrações de nanoemulsão nos filmes aumentou a resistência ao vapor de água, e gerou filmes mais elásticos, menos rígidos e mais homogêneos. A NOEM interferiu na organização molecular dos filmes e apresentaram aumento do caráter hidrofóbico com o aumento da concentração de NOEM. A capacidade antifúngica NOEM quando incorporada nos filmes para *B. cinerea* e *R. stolonifer* foi observada para concentrações de 0,25, 0,38 e 0,50 % de óleo de menta.

Nesse estudo mostrou-se que a redução no tamanho das gotículas de óleo pela técnica de nanoemulsão foi eficaz para melhorar distribuição e homogeneização na matriz do filme obtido, além de aumentar a capacidade antifúngica do óleo nos filmes.

4.5 Referências Bibliográficas

ALEXANDRE, E. M. C., LOURENÇO, R. V., BITTANTE, A. M. Q. B., MORAES, I. C. F., SOBRAL, P. J. A. **Gelatin-based films reinforced with montmorillonite and activated with nanoemulsion of ginger essential oil for food packaging applications.** Food Packaging and Shelf Life, v. 10, p. 87–96, 2016.

ACEVEDO-FANI, A., SALVIA-TRUJILLO, L., ROJAS-GRAÜ, M. A., MARTÍN-BELLOSO, O. **Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties.** Food Hydrocolloids, v. 47, p. 168 - 177, 2015.

BENBETTAÏEB, N.; CHAMBIN, O.; ASSIFAOU, A.; AL-ASSAF, S.; ARBOWIAK, T.; DEBEAUFORT, F. **Release of coumarin incorporated into chitosan-gelatin irradiated films.** Food Hydrocolloids. v. 56, p. 266-276, 2016.

BORGES, C. D., MENDONÇA, C. R. B., ZAMBIAZI, R. C., NOGUEIRA, D., PINTO, E. M., PAIVA, F. F. **Strawberries conservation with coatings based on xanthan gum and sage essential oil.** Bioscience Journal, v. 29, p. 1071-1083, 2013.

CHEONG, J. N.; TAN, C. P.; MAN, Y. B. C; MISRAN, M. **α -Tocopherol nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation.** Journal of Food Engineering, v. 89, p. 204-209, 2008.

COMBRINCK, S., REGNIER, T., KAMATOU, G. P. P. **In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit.** Industrial Crops and Products, v. 33, p. 344–349, 2011.

COZMUTA, A. M.; TURILA, A.; APJOK, R.; CIOCIAN, A.; COZMUTA, L. M.; PETER, A.; NICULA, C.; GALIC, N.; BENKOVIC, T. **Preparation and characterization of improved gelatin films incorporating hemp and sage oils.** Food Hydrocolloids, v. 49, p. 144-155, 2015.

DAMMAK, I.; CARVALHO, R. A.; TRINDADE, C. S. F.; LOURENÇO, R. V.; SOBRAL, P. J. A. **Properties of active gelatin films incorporated with rutin-loaded nanoemulsions.** International Journal of Biological Macromolecules. v. 98, p. 39–49, 2017.

DONSÌ, F., FERRARI G. **Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food.** Journal of Biotechnology, v. 233, p. 106–120, 2016.

GHANI, S.; BARZEGAR, H.; NOSHAD, M.; HOJJATI, M. **The preparation, characterization and in vitro application evaluation of soluble soybean polysaccharide films incorporated with cinnamon essential oil nanoemulsions.** International Journal of Biological Macromolecules. v. 112, p. 197–202, 2018.

GAHRUIE H. H., ZIAEE E., ESKANDARI M. H., HOSSEINI S. M. H. **Characterization of basil seed gum-based edible films incorporated with *Zataria multiflora* essential oil nanoemulsion.** Carbohydrate Polymers, v.166, p. 93–103, 2017.

KIM, H.; BEAK, S.; SONG, K. B. **Development of a hagfish skin gelatin film containing cinnamon bark essential oil.** LWT - Food Science and Technology. v. 96, p. 583–588, 2018.

MA, W.; TANG, C.; YIN, S.; YANG, X.; LIU, F.; WEI, Z. **Characterization of gelatin-based edible films incorporated with olive oil.** Food Research Internatinal. J., v. 49, p. 572-579, 2012.

MCCLEMENTS, D. J. **Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance.** Soft Matter, v. 7, n. 6, p. 2297, 2011.

MCCLEMENTS, D. J., RAO, J. **Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 51, p. 285–330, 2011.

MENESES, A. C. **Encapsulação De Óleo De Cravo Em Nanopartículas Lipídicas E Poliméricas Em Sistema Livre De Solvente.** 2016, p. 115. Dissertação de mestrado, Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

PÉREZ CÓRDOBA L.J. P., SOBRAL P. J.A. **Physical and antioxidant properties of films based on gelatin, gelatin-chitosan or gelatin-sodium caseinate blends loaded with nanoemulsified active compounds.** Journal of Food Engineering, v.213, 47- 53, 2017.

OTONI, C. G., MOURA, M. R., AOUADA, F. A., CAMILLOTO, G. P., CRUZ, R. S., LOREVICE, M. V., SOARES, N. F. F., MATTOSO, L. H. C. **Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films.** Food Hydrocolloids, v. 41, p. 188 - 194, 2014.

ROCCA-SMITH, J.R.; MARCUZZO, E.; KARBOWIAK, T.; CENTA, J.; GIACOMETTI, M.; SCAPIN, F.; VENIR, E.; SENSIDONI, A.; DEBEAUFORT, F. **Effect of lipid incorporation on functional properties of wheat gluten based edible films.** Journal of Cereal Science. v. 69, p. 275-282, 2016.

SEVERINO, R., VU, K.D., DONSI, F., SALMIERI, S., FERRARI, G., LACROIX, M. **Antibacterial and physical effects of modified chitosan based-coating containing nanoemulsion of mandarin essential oil and three non-thermal treatments against Listeria innocua in green beans.** International Journal of Food Microbiology, 191, 82–88, 2014.

SEVERINO, R., FERRARI, G., VU, K.D., DONSI, F., SALMIERI, S., LACROIX, M. **Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium on green beans.** Food Control, v. 50, p. 215–222, 2015.

TIWARI, P. **Recent advances and challenges in trichome research and essential oil biosynthesis in Mentha arvensis L.** Industrial Crops and Products, v. 82, p. 141–148, 2016.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODIPRAN, T. **Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils.** *Journal of Food Engineering*, v. 117, p. 350 – 360, 2013.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODIPRAN, T.; NILSUWAN, K. **Emulsion film based on fish skin gelatin and palm oil: Physical, structural and thermal properties.** Food Hydrocolloids, v. 48, p. 248 – 259, 2015.

WU, J.; LIU, H.; GE, S.; WANG, S.; QIN, Z.; CHEN, L.; ZHENG, Q.; LIU, Q.; ZHANG, Q. **The preparation, characterization, antimicrobial stability and in vitro release evaluation of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil nanoliposomes.** Food Hydrocolloids, v. 43, p. 427–435, 2015.

VOGLER, E. A. **Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces.** Advances in Colloid and Interface Science, v. 74, p. 69–117, 1998.

VU, K. D., HOLLINGSWORTH, R.G., LEROUX, E., SALMIERI, S., LACROIX, M. **Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries.** Food Research International, v. 44, p. 198–203, 2011.

CAPÍTULO 5. APLICAÇÃO DE COBERTURAS COMESTÍVEIS À BASE DE GELATINA ADICIONADAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE MENTA EM MORANGOS (*Fragaria x ananassa*): AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E INFLUÊNCIA NA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DO FRUTO

Resumo

O uso de coberturas comestíveis incorporadas de antimicrobianos naturais tem se mostrado promissora na extensão da vida útil de diferentes frutos. Por ser susceptível ao ataque por fungos, o morango foi selecionado como modelo para avaliar a eficácia antifúngica do óleo essencial de menta como o agente antifúngico, incorporado em coberturas comestíveis à base de gelatina. Inicialmente, as coberturas comestíveis de gelatina contendo OEM e NOEM (0; 0,06; 0,13; 0,25; 0,38; 0,5 % (g óleo/g gelatina)) foram aplicadas em morangos inoculados com *B. cinerea* e *R. stolonifer*. Os frutos revestidos das diferentes coberturas foram acondicionados a 15 °C e 95 % UR. Para a escolha da melhor formulação, foram avaliados a inibição de desenvolvimento fúngico, taxa de respiração, produção de etileno e firmeza dos morangos. Os resultados mostraram que, independentemente da forma que o óleo é adicionado na solução de cobertura comestível, as concentrações acima de 0,25 % de óleo de menta escurecem a superfície dos morangos e ocorre quebra da parede celular, causando o amolecimento do fruto. A inibição do desenvolvimento dos fungos foi nas menores concentrações de OEM e NOEM. As coberturas comestíveis sem e com óleo de menta reduziram a taxa de respiração dos morangos e a produção de etileno comparados ao controle. A firmeza dos morangos foi afetada pelas coberturas com concentrações de 0,13 % de óleo de menta na formulação, enquanto que 0,06 % de óleo mantiveram a firmeza dos morangos.

Nesta etapa do trabalho, os morangos foram revestidos utilizando-se a cobertura contendo 0,06 % de óleo essencial de menta porque apresentou os melhores resultados na etapa anterior. Os morangos foram higienizados com luz UV-C numa dose de 3,8 kJ/m² por 2 min e revestidos com cobertura comestível A₁ (0,06 %) e avaliados quanto ao desenvolvimento fúngico, perda de massa, cor, firmeza, taxa de respiração, pH, sólidos solúveis totais, açúcares, ácidos orgânicos, capacidade antioxidante, compostos fenólicos totais e antocianinas totais. 0,06 % OEM na cobertura reduziu o desenvolvimento fúngico dos

morangos, apresentou menor perda de massa e menor taxa de respiração quando comparados aos frutos sem cobertura. O OEM na cobertura de gelatina não interferiu na cor dos morangos e na firmeza. Além disso, o uso de 0,06 % OEM na cobertura apresentou os melhores resultados quanto ao pH, SST, açúcares, ácidos orgânicos, capacidade antioxidante e compostos fenólicos por 8 dias de armazenamento a 6 °C e 95 % UR, mostrando ser eficaz para retardar a senescência de frutos de morango pós colheita.

5.1 Introdução

O morango (*Fragaria x Ananassa Duch*) pós colheita é um fruto que desidrata rapidamente, sofre danos mecânicos e tem curta vida útil principalmente por deterioração fúngica. Os principais fungos deteriorantes de morangos são *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer*. Minimizar as injúrias físicas e retardar o desenvolvimento dos fungos em morangos e aumentar sua vida de prateleira e tempo de comercialização é um grande desafio para o setor (VU et al., 2011; EL-MOGY e ALSANIUS, 2012). Uma alternativa possível desse desafio é o uso de coberturas comestíveis e antimicrobianas naturais associados. Estudos referentes à aplicação de coberturas comestíveis com agentes antimicrobianos naturais têm sido realizados e mostram bons resultados quanto à proteção e extensão do tempo de vida útil de alguns produtos alimentícios. Além disso, por serem oriundos de fontes naturais e saudáveis em relação aos materiais químicos sintéticos, torna-se atrativos ao consumidor (DIAB et al., 2001; BORGES et al., 2013; SEVERINO et al., 2014a; GUERREIRO et al., 2015).

Por apresentarem ação antimicrobiana, os óleos essenciais vêm ganhando atenção como aditivo natural para aplicação em alimentos. São geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA) (PERSICO et al., 2009) e sua incorporação em películas de gelatina, proporcionam atividade antimicrobiana e também melhoram as propriedades físico-químicas do filme, como relatados por alguns estudos (PIRES et al., 2011; TONGNUANCHAN, BENJAKUL e PRODIPRAN, 2012; TONGNUANCHAN, BENJAKUL e PRODIPRAN, 2013). O óleo essencial de menta da espécie *Mentha arvensis* tem como componente principal o mentol, o qual é responsável pela atividade antimicrobiana do óleo (TIWARI, 2016). Estudos recentes relataram sua intensa atividade contra diferentes fungos, dentre eles o *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer* (ABBASZADEH et al., 2014;

COMBRINCK, REGNIER e KAMATOU, 2011; GUERRA et al., 2015). No entanto, suas propriedades hidrofóbicas e sabor forte restringem sua aplicação direta em alimentos.

Sistemas de distribuição de óleos essenciais em nanoescala têm apresentado eficiência quanto à estabilidade físico-química e biológica pela ativação de mecanismos passivos de absorção celular e pelo aumento da área de superfície, fazendo com que a quantidade de óleo e seus efeitos sensoriais sejam reduzidos (DONSI et al. 2011; DONSI e FERRARI, 2016). A incorporação desses óleos em matriz polimérica na forma de nanoemulsões melhora as propriedades de barreira dos filmes e/ou coberturas e mostra distribuição mais homogênea na matriz polimérica (OTONI et al., 2014; SEVERINO et al., 2014a; SEVERINO et al., 2014b; SEVERINO et al., 2015; DONSI et al., 2015).

Combinação de diferentes técnicas também podem resultar em vantagens para o morango. Como exemplo, uso de irradiação UV-C como pré tratamento, recobrimento do fruto com coberturas comestíveis antimicrobiana retardam a senescência pós-colheita e proporcionam segurança de frutos e hortaliças (ALEXANDRE, BRANDÃO e SILVA, 2012; SHIN, SONG e SONG, 2012; SEVERINO et al., 2014a; SEVERINO et al., 2015; URBAN et al., 2016).

O presente trabalho teve como foco principal aplicar coberturas comestíveis à base de gelatina contendo OEM e NOEM em morangos sem e com tratamento UV-C e avaliar sua ação contra o desenvolvimento de *B. cinerea* e *R. stolonifer*.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Material e matéria-prima

Gelatina bovina Tipo B doada por Gelnex *The Gelatin Specialist* (Itá, Santa Catarina, Brasil), óleo essencial de menta (*Mentha arvensis*) (L-mentol = 40 %, mentona = 24 %, acetato de mentila = 4 %, isomentona = 10 %) adquirido da Ferquima Indústria e Comercio LTDA (Vargem Grande, São Paulo, Brasil), glicerina (C₃H₈O₃), Tween 80 (C₆₄H₁₂₄O₂₆) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). *Rhizopus stolonifer* (CBMAI 1551) foi doado pelo Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina e *Botrytis cinerea* (CBMAI 863) adquirido da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria – CBMAI/DRM,

UNICAMP, Paulínia, São Paulo.

Morangos frescos foram comprados em mercado local (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil) e mantidos a 6 °C até o início das análises. Foram selecionados quanto à cor, tamanho, sem danos físicos ou infecção visual, retiradas as sépalas e qualquer sujidades superficiais sem uso de água.

5.2.2 Preparo das soluções de cobertura comestível

As soluções de cobertura comestível à base de gelatina sem óleo e com OEM (0; 0,06; 0,13; 0,25; 0,38; 0,50 % (g/g gelatina)) foram preparadas conforme método descrito no item 3.2.2.

A nanoemulsão do óleo essencial de menta foi preparada conforme método descrito no item 4.2.1. As coberturas com NOEM (0; 0,06; 0,13; 0,25; 0,38; 0,50 % (g OEM/g gelatina)) foram preparadas conforme método descrito no item 4.2.3.

5.2.3 Incorporação de OEM e NOEM nas coberturas e sua influência no desenvolvimento fúngico de morangos inoculados com *B. cinerea* e *R. stolonifer*

Os morangos, previamente selecionados, foram feridos na superfície uma vez na região equatorial com ponta de 1 mm de largura e 2 mm de comprimento de uma haste de aço inoxidável, de acordo com Fagundes et al. (2013). Foram inoculados 10 µL de uma suspensão de esporos contendo 1×10^5 esporos/mL dos fungos *B. cinerea* ou *R. stolonifer*, em seguida acondicionados a 20 °C por 24 h. Após, os morangos foram imersos por 1 min nas soluções sem e com óleo de menta (OEM e NOEM) separadamente. Após removidos da solução, os frutos foram drenados em tela de *nylon* e secos a 15 °C por 20 min. Morangos inoculados, mas não revestidos foram utilizados como controles. Em seguida, 10 frutos (aproximadamente 125 ± 5 g) foram adicionados em embalagens rígidas de polipropileno transparentes de dimensões 20 x 12 x 5 cm, armazenados a 15 °C e 95 % UR. Todos os experimentos foram realizados em triplicata de acordo com Fagundes et al. (2013), com modificações.

A temperatura de 15 °C foi escolhida para acelerar o teste de vida útil dos morangos. Nessa condição foram avaliados o desenvolvimento fúngico, taxa de respiração, produção de etileno e firmeza (teste de perfuração).

5.2.3.4 Desenvolvimento Fúngico Visual

O desenvolvimento dos fungos de *B. cinerea* ou *R. stolonifer* foi calculado como a porcentagem de morangos contaminados. O desenvolvimento foi avaliado no primeiro dia (dia 0) e a cada 2 dias durante 4 dias através de análise visual (FAGUNDES et al., 2013; GUERRA et al., 2015).

5.2.3.5 Taxa de Respiração

As taxas de respiração dos morangos foram determinadas a partir das concentrações do O₂ e CO₂ obtidas em um analisador de gás (PBI Dansensor, CheckMate II, Dinamarca) (PERDONES et al., 2016). Três frutos (aproximadamente 17 ± 2 g) foram colocados dentro de um recipiente de vidro (200 mL) hermeticamente fechado, contendo ar atmosférico. As análises dos gases foram realizadas nas primeiras 6 h em intervalos de 1 h e após 24 h, até equilíbrio, em triplicata de experimentos. As taxas de respiração dos frutos foram calculadas utilizando modelo proposto por Torrieri, Cavella e Masi (2009), mostrado nas Equações 4 e 5.

$$RR_{O_2}(t) = -\frac{V_f}{W100} \frac{dO_2}{dt} \quad (4)$$

$$RR_{CO_2}(t) = \frac{V_f}{W100} \frac{dCO_2}{dt} \quad (5)$$

Onde: RR_{O₂} é a taxa de consumo de O₂, RR_{CO₂} é a taxa de produção de CO₂, V_f é o volume final dentro do frasco (mL), W é a massa da amostra (kg) e $\frac{dO_2}{dt}$ e $\frac{dCO_2}{dt}$ são as variações das concentrações de O₂ e CO₂ ao longo do tempo de análise.

5.2.3.6 Produção de Etileno

A determinação da produção de etileno dos morangos foi realizada de acordo com o proposto por Li et al. (2014) e Basso, Moreira e José (2018), com modificações. Amostras de 3 frutos

(aproximadamente 17 ± 2 g) foram colocados dentro de um recipiente de vidro (200 mL) hermeticamente fechado, contendo ar atmosférico. Após 3 h, 5 h, 7 h e 24 h foram coletadas alíquotas do ar do interior da embalagem utilizando-se uma seringa de 250 μ L (1725RN, Hamilton), cuja amostra de ar foi injetada em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrofotômetro de massas (GC/QP 2010 Plus, Shimadzu, Japão) equipado com uma coluna capilar (Supel-Q-Plot, Supelco) à temperatura de 28 °C. A concentração volumétrica de etileno foi quantificada usando um padrão de calibração externo e os resultados foram expressos em μ L/kg FF (fruta fresca). As análises foram realizadas no Laboratório de Energia e Meio Ambiente (LEMA), do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

5.2.3.7 Firmeza

A firmeza dos frutos foi realizada seguindo o método proposto por Sánchez-González et al. (2011), com modificações. Utilizou-se um texturômetro TA.HD plus (Texture Analyser, Stable Micro Systems, Reino Unido) com célula de carga de 50 kg. O teste de perfuração 5 mm de profundidade foi realizado com uma sonda de 2 mm de diâmetro, velocidade de teste de 3,3 mm/s, velocidade de pré-teste de 3 mm/s, velocidade de pós-teste de 5 mm/s. Para o teste de compressão foi utilizado uma sonda cilíndrica em alumínio com 50 mm de diâmetro e velocidade do teste, pré-teste e pós-teste de 1 mm/s, 2 mm/s e 5 mm/s, respectivamente. Os resultados foram apresentados pela força máxima na perfuração (N) e força máxima na compressão (N). As análises foram realizadas no primeiro dia (dia 0) e a cada 2 dias durante o armazenamento.

5.2.4 Revestimento de morangos sanitizados por luz UV-C

Para aplicação da UV-C, utilizou-se a cobertura comestível que apresentou melhor inibição de desenvolvimento dos fungos *B. cinerea* e *R. stolonifer*, associado aos resultados de taxa de respiração, produção de etileno e firmeza na primeira etapa do trabalho.

5.2.4.1 Sanitização por luz UV-C

Os morangos, previamente selecionados, foram sanitizados por radiação UV-C, utilizando câmara de radiação com controle de temperatura (Figura 5.1) montada no Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina durante a execução deste trabalho. Foram instaladas 16 lâmpadas germicidas UV-C (Osram 24 W, 2G11, Munique, Alemanha), de comprimento de onda de 254 nm, distribuídas na parte superior, inferior e laterais da câmara. A dose de radiação total aplicada nos frutos foi de 3,8 kJ/m² por 2 min a temperatura 10 °C ± 0,5 °C. A dose utilizada neste estudo foi baseada em Araque et al. (2018), Batista, 2017 e Xie et al. (2016). A dose de radiação UV-C da câmara foi medida por um foto radiômetro (Modelo HD2302.0 LightMeter, Delta OHM, com probe irradiance LP 471 UVC, range 220 - 280 nm, Caselle di Selvazzano, Itália).

Figura 5.1 – Câmara UV-C refrigerada.



Fonte: Autor.

5.2.4.2 Aplicação do revestimento

A solução de cobertura comestível sem óleo e a solução de cobertura contendo 0,06 % de OEM (A₁) foram preparadas conforme item 3.2.2, capítulo 3. Os tratamentos dos morangos realizados nesta etapa foram:

- Controle = sem aplicação de UV-C e sem cobertura
- UVC (sem cobertura) = com aplicação de UV-C e sem cobertura

- A₀ (sem OEM) = com aplicação de UV-C e com cobertura sem OEM

- A₁ (0,06 % OEM) = com aplicação de UV-C e com cobertura com 0,06 % de OEM

Os morangos dos grupos com revestimento A₀ e A₁ foram imersos na solução comestível, separadamente, durante 1 min sob agitação utilizando um bastão de vidro. Os frutos foram dispostos sobre uma tela de *nylon* para drenagem da solução em excesso e secagem a 15 °C por 20 min. Após, os frutos dos diferentes tratamentos foram embalados em embalagens rígidas de polipropileno transparentes (20 x 12 x 5 cm) e acondicionado a 6 °C e 95 % UR, de acordo com Guerra et al. (2015), com modificações.

5.2.4.3. Caracterização físico-química dos morangos

Os morangos dos quatro tratamentos foram caracterizados no primeiro dia (dia 0) e a cada 2 dias de armazenamento. Quando os frutos apresentaram 20 % de desenvolvimento fúngico as análises e o armazenamento foram interrompidos (OREGEL-ZAMUDIO et al., 2017). As análises foram desenvolvimento fúngico visual, perda de massa, cor, firmeza, taxa de respiração, pH, sólidos solúveis totais (SST), atividade antioxidante, compostos fenólicos totais, açúcares, ácidos orgânicos e antocianinas totais.

Desenvolvimento Fúngico Visual

O desenvolvimento fúngico foi realizado por análise visual, foi calculado como a porcentagem de morangos contaminados. O desenvolvimento foi avaliado no primeiro dia (dia 0) e a cada 2 dias até porcentagem de frutos inaceitáveis, com mais de 20 % de desenvolvimento fúngico (FAGUNDES et al., 2013; GUERRA et al., 2015; OREGEL-ZAMUDIO et al., 2017).

Perda de Massa

A perda de massa dos frutos foi determinada em balança semi analítica com precisão de 0,01 g (Marte, AS2000C, Brasil). Lotes de frutos por tratamento foram pesados no dia inicial (dia 0) e ao longo do armazenamento. As análises foram não destrutivas, ou seja, os mesmos

lotes foram pesados no período de armazenamento (dia 0, 2, 4, 8, 10, etc.). A perda de massa foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$PM (\%) = 1 - \frac{M_n}{M_o} * 100 \quad (1)$$

Sendo: PM a perda de massa (%), Mo a massa no tempo inicial do armazenamento; Mn a massa para os dias posteriores de análise (COTE et al., 2013).

Cor

A cor dos frutos foi determinada utilizando um sistema de visão computacional, através de *software* ImageJv 1.6.0 (National Institutes of Health, Bethesda, USA) e uma câmara fotográfica (Nikon D5500, Nikon Corporation, Japão) para aquisição das imagens dos frutos. A região central de cada fruto da imagem obtida anteriormente foi selecionada, e essa região foi tratada usando *plug-in* Color Space Converter que converte as cores do sistema RGB para a escala CIELab. A coordenada “L*” expressa o grau de luminosidade da cor medida (L* = 0 (preto) a 100 (branco)), os valores de “a*” expressam o grau de variação entre o vermelho e o verde (a* positivo = vermelho, a* negativo = verde), e a coordenada “b*” o grau de variação entre a cor azul e o amarelo (b* positivo = amarelo, b* negativo = azul). O método utilizado foi descrito por Cárdenas-Pérez et al. (2017), com modificações.

Firmeza

A firmeza dos frutos dos diferentes tratamentos foi realizada para os testes de perfuração e compressão de acordo com o descrito no item 5.2.3.1.

Taxa de Respiração

As taxas de respiração dos morangos dos diferentes tratamentos foram determinadas de acordo com item 5.3.3.1.

pH e Sólidos Solúveis Totais (SST)

O pH dos morangos foi obtido em pHmetro de bancada (Quimis, Q400AS, Brasil), conforme Oregel-Zamudio et al. (2017). Amostras dos

morangos foram liquidificadas e o pH obtido por leitura direta do suco puro do morango, realizados em triplicata.

O teor de sólidos solúveis totais foi obtido utilizando refratômetro digital (ATAGO, PAL-BY/RI, Japão) com capacidade de determinação de 0-93 °Brix. Três gotas do suco concentrado dos morangos foram utilizadas para a leitura. Os resultados foram expressos em °Brix (OREGEL-ZAMUDIO et al., 2017).

Açúcares e Ácidos Orgânicos

Polpas puras dos morangos dos diferentes tratamentos aplicados no presente trabalho foram congeladas em ultra freezer. 5 g de polpa descongelada, de cada tratamento, foi diluída em água ultra pura e solução de ácido sulfúrico em pH = 2,5 para determinação dos açúcares e ácidos orgânicos, respectivamente. As amostras foram colocadas em banho de ultrassom por 10 min e centrifugadas à 9000 rpm por 20 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro e novamente filtrado em filtro de membrana de 0,45 µm (Minisart CE, Sartorius Stedim).

A determinação de açúcares e ácidos orgânicos do suco dos morangos foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE - Perkin Elmer série 200, Massachusetts, EUA) e *software* Totalchrom navigator 6.2.1 (Perkin Elmer série 200, Massachusetts, EUA), seguindo metodologia de Gunduz e Ozdemir (2014), com modificações. Os açúcares foram quantificados quanto ao teor de frutose, glicose e sacarose, utilizando um detector de índice de refração (IR) (Perkin Elmer série 200, Massachusetts, EUA) e separação através de coluna amino Lichrospher NH2-5 (250 x 4,6 mm I.D.) à temperatura de 30 °C e fluxo de 0,3 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL e a fase móvel utilizada foi 80 % acetonitrila e 20 % água ultra pura. Os resultados foram expressos em mg/g de FF (fruta fresca).

Os ácidos orgânicos quantificados foram ácido cítrico e ácido málico (principais ácidos do morango) usando um detector UV (Perkin Elmer série 200, Massachusetts, EUA) e comprimento de onda de 215 nm. A separação dos ácidos se deu através de coluna Univ-S-OD2 (C18) (250 x 4,6 mm I.D.), temperatura de 30 °C e fluxo de 0,5 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL e a fase móvel utilizada foi 95 % de solução de ácido sulfúrico (pH = 2,5) (Solvente A) e 5 % de metanol (Solvente B). Os resultados foram expressos em mg/g de FF (fruta fresca).

Capacidade Antioxidante e Compostos Fenólicos Totais

Aproximadamente 1 g da polpa pura do morango foi extraída com 9 mL de metanol 80 % por 10 min em banho de ultrasson (Unique, 1400A, São Paulo, Brasil) a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 9000 rpm por 20 min (Quimis, Q222T, São Paulo, Brasil). Foram utilizados os sobrenadantes para as análises da capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais.

A capacidade antioxidante dos morangos foi determinada pela técnica de captura do radical ABTS (2,2 AZINO BIS (3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid)) por antioxidantes, de acordo com Rufino et al. (2007a). A solução metanólica de morango foi adicionada na solução ABTS e homogeneizada por 6 min. Em seguida, mediu-se a absorvância das amostras a 734 nm em espectrofotômetro (QUIMIS, Q898U2M5, São Paulo, Brasil). Etanol puro foi utilizado como branco. A curva padrão de ácido gálico seguiu o mesmo procedimento. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico por g de fruta fresca (mg ác. gálico/g FF). As análises foram realizadas em triplicatas.

A técnica de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), adaptada de Rufino et al. (2007b) foi empregada para avaliar a capacidade antioxidante dos morangos. A amostra, morango/metanol, foi misturada com solução de DPPH e deixou-se reagir por 30 min. Em seguida, as absorvâncias das amostras foram medidas a 515 nm utilizando espectrofotômetro (QUIMIS, Q898U2M5, Diadema, São Paulo). Metanol puro foi utilizado como branco. A partir do mesmo procedimento, foi realizada a curva padrão de ácido gálico e os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico por g de fruta fresca (mg ác. gálico/g FF). As análises foram realizadas em triplicatas.

Os compostos fenólicos totais foram determinados de acordo com o método de Singleton e Rossi (1965) usando reagente Folin – Ciocalteau. Após neutralização da amostra, a mistura foi mantida no escuro por 2 h. A leitura das absorvâncias foi em espectrofotômetro (QUIMIS, Q898U2M5, Diadema, São Paulo) a 765 nm e os resultados foram expressos por mg de equivalente de ácido gálico por g de fruta fresca (mg ác.gálico/g FF). O mesmo procedimento foi utilizado para construir curva padrão de ácido gálico. As análises foram realizadas em triplicatas.

Antocianinas Totais

A determinação do teor de antocianinas totais foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), bomba quaternária, desgaseificador e amostrador automático (Perkin Elmer série 200, Massachusetts, EUA). Os dados foram analisados em *software* Chromera[®] Workstation. A separação das antocianinas se deu por coluna Brownlee Choice C18 Perkin Elmer C18 (150 x 4,6 mm I.D.), temperatura de 21 °C e fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL e a fase móvel utilizada com gradiente linear composta por metanol (Solvente A) e solução aquosa de 3 % de ácido fórmico (Solvente B). Um fluxo isocrático de 10 % de A (0 a 2 min) seguido por gradiente linear até 20 % A (2 a 3 min), 41 % A (3 a 16 min), aumentando para 70 % A (11 min). Os cromatogramas foram monitorados a 520 nm e os espectros adquiridos na faixa de 190 a 700 nm. O principal pico foi comparado com a substância de referência (pelargonidina-3-*O*-glicosídeo). O teor de antocianinas totais foi expresso em equivalentes de pelargonidina-3-*O*-glicosídeo por g de fruta fresca (mg/g de FF). As análises de antocianinas foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina.

5.2.5 Análise Estatística

O *software* Statistica 10 (Stafsoft Inc., EUA) foi utilizado para avaliar os resultados por meio de análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância.

5.3 Resultados

5.3.1 Influência do OEM e NOEM das coberturas comestíveis aplicadas em morangos inoculados

Foram aplicadas todas as formulações de coberturas comestíveis adicionadas de OEM e NOEM em morangos inoculados com *B. cinerea* e *R. stolonifer*. Foi verificado visualmente que, logo após a aplicação das coberturas comestíveis em concentrações acima de 0,25 % de óleo de menta nas formulações, os morangos apresentaram escurecimento, queima da pele, perda de brilho e amolecimento da parede celular,

caracterizando o efeito negativo dessas formulações de coberturas para os morangos, devido às altas concentrações de óleo de menta. Em pesquisa realizada por Sangsuwan et al. (2016), os autores relataram que o uso de esferas de quitosana contendo óleo essencial de lavanda ou tomilho em altas concentrações nas embalagens de morangos promoveram a queima da pele dos frutos a partir do 8 dia de armazenamento. A partir desses resultados, morangos foram recobertos com as coberturas comestíveis A₀ (sem OEM), A₁ (0,06 % OEM), A₂ (0,13 % OEM), N₁ (0,06 % OEM), N₂ (0,13 % OEM).

Desenvolvimento Fúngico Visual

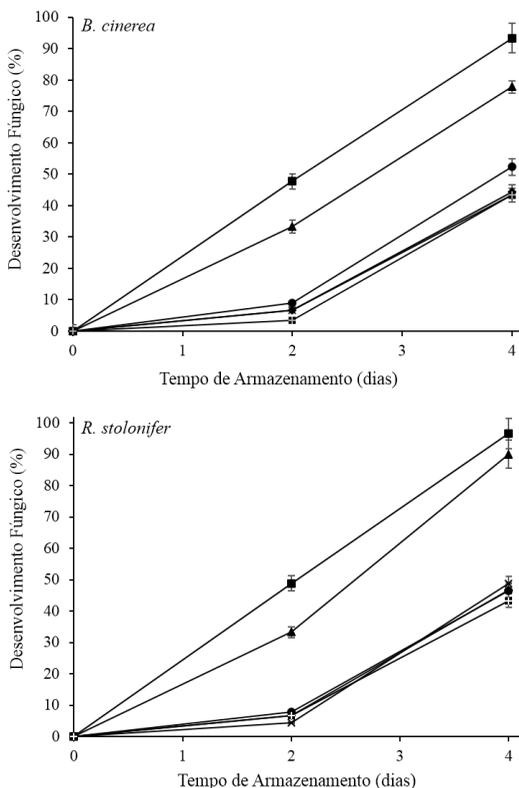
Na Figura 5.2 estão representados o desenvolvimento fúngico nos morangos inoculados sem cobertura, morangos com cobertura comestível sem óleo, com cobertura adicionada de OEM e com cobertura adicionada de NOEM durante armazenamento a 15 °C e 95 % UR, expresso como porcentagem de frutos visivelmente contaminados.

As coberturas comestíveis contendo OEM e NOEM na formulação (A₁, A₂, N₁ e N₂) reduziram significativamente ($p < 0,05$) o desenvolvimento dos fungos inoculados em morangos, comparados aos morangos controle e os recobertos sem óleo (A₀), durante 4 dias de armazenamento. Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) no desenvolvimentos dos fungos entre os morangos com coberturas contendo OEM e NOEM. Apesar da avaliação *in vitro* das coberturas contendo menores concentrações de óleo de menta não terem apresentado capacidade antifúngica para *B. cinerea* e *R. stolonifer*, o presente estudo mostrou que quando incorporados na cobertura, apresentou redução do desenvolvimento dos fungos nos morangos. As interações entre os componentes das coberturas e a superfície da fruta levou a um comportamento oposto com relação aos resultados observados no estudo *in vitro*, capítulo 3 e 4. Uma explicação provável, é que o óleo de menta tenha volatilizado dos filmes durante o processo de secagem, uma vez que tanto o óleo puro e adicionado nas coberturas revestindo os morangos houve inibição do desenvolvimento dos fungos estudados no presente trabalho.

Resultados semelhantes foram relatados por Perdones et al. (2012) e Vu et al. (2011), para o desenvolvimento fúngico em morangos inoculados com *B. cinerea* ou *R. stolonifer* e aplicados de revestimentos de quitosana com óleos essenciais de limão e menta. Vu et al. (2011)

relataram que os óleos essenciais de limão puros não apresentaram atividade antifúngica no teste *in vitro*, mas após a incorporação nos revestimentos e aplicados em morangos os resultados do desenvolvimento fúngico foram menores comparados aos morangos controle.

Figura 5.2 – Desenvolvimento fúngico de morangos inoculados sem cobertura e com cobertura armazenados a 15 °C e 95 % UR. (—■— Controle, —▲— A₀ (sem OEM), —●— A₁ (0,06 %), —×— A₂ (0,13 %), —◆— N₁ (0,06 %) e —■— N₂ (0,13 %). Valores médios e intervalos de 95 % de HSD pelo teste de Tukey.



Fonte: Autor.

Taxa de Respiração

Na Figura 5.3 observa-se que o consumo de O₂ e produção de CO₂ dos lotes de morangos inoculados com *B. cinerea* não apresentaram diferença com relação aos morangos inoculados com *R. stolonifer*. No entanto, as coberturas comestíveis A₀ (sem OEM) e as adicionadas de OEM e NOEM aplicadas nos morangos favoreceram a redução do consumo de O₂ e produção de CO₂ comparados aos frutos controle no tempo de 24 h de armazenamento. Não houve diferença ($p > 0,05$) no consumo de O₂ e produção de CO₂ entre os morangos com as diferentes coberturas, indicando que o OEM e a NOEM não interferiram nesses resultados no tempo de 24 h, e que a taxa de respiração não é influenciada pela forma como o óleo de menta foi incorporado na solução, mas sim pela cobertura, a qual apresenta baixa permeabilidade ao O₂ e CO₂ de acordo com a literatura (NILSUWAN, BENJAKUL e PRODPRAN, 2016).

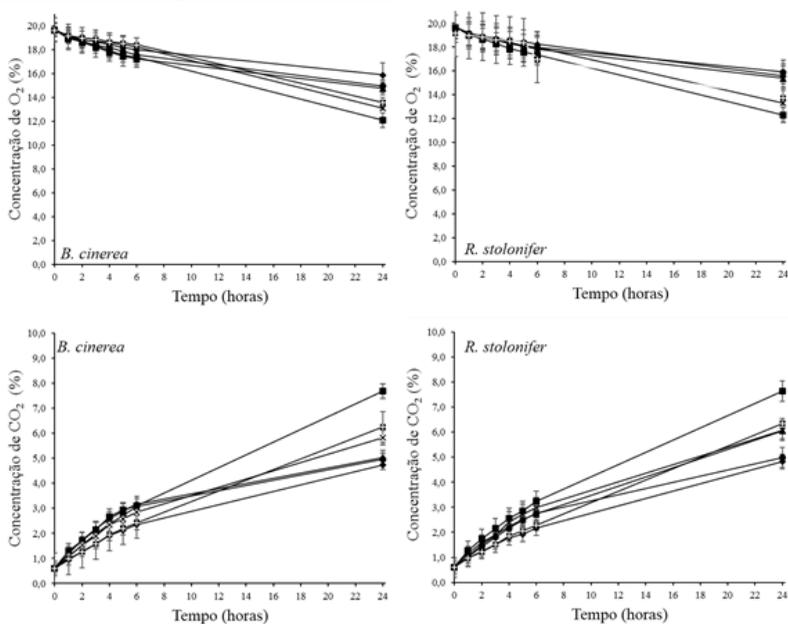
As taxas de respiração foram obtidas a partir das concentrações de O₂ e CO₂ dos morangos, no tempo de 24 h de armazenamento à 15 °C. O modelo utilizado para obtenção da taxa de respiração dos morangos foi validado por Torrieri, Cavella e Masi (2009) para maçãs frescas cortadas.

Os resultados das taxas de respiração quanto ao consumo de O₂ e produção de CO₂ dos diferentes tratamentos com morangos inoculados por *B. cinerea* e *R. stolonifer* estão representados através da Figura 5.4. A taxa de respiração foi mais baixa para os frutos com cobertura. Também, as taxas de respiração das amostras com coberturas sem óleo e com adição de óleo não diferiram ($p > 0,05$) entre si, o que indica que coberturas à base de gelatina podem reduzir as trocas gasosas da superfície do morango com o meio ambiente, e que o óleo de menta nas concentrações utilizadas nessas formulações não afetaram o padrão respiratório dos frutos.

A redução na taxa do consumo de O₂ e produção de CO₂ de morangos com coberturas comestíveis de quitosana com óleo essencial de limão, também, foi relatada por Perdones et al. (2012) e (2016).

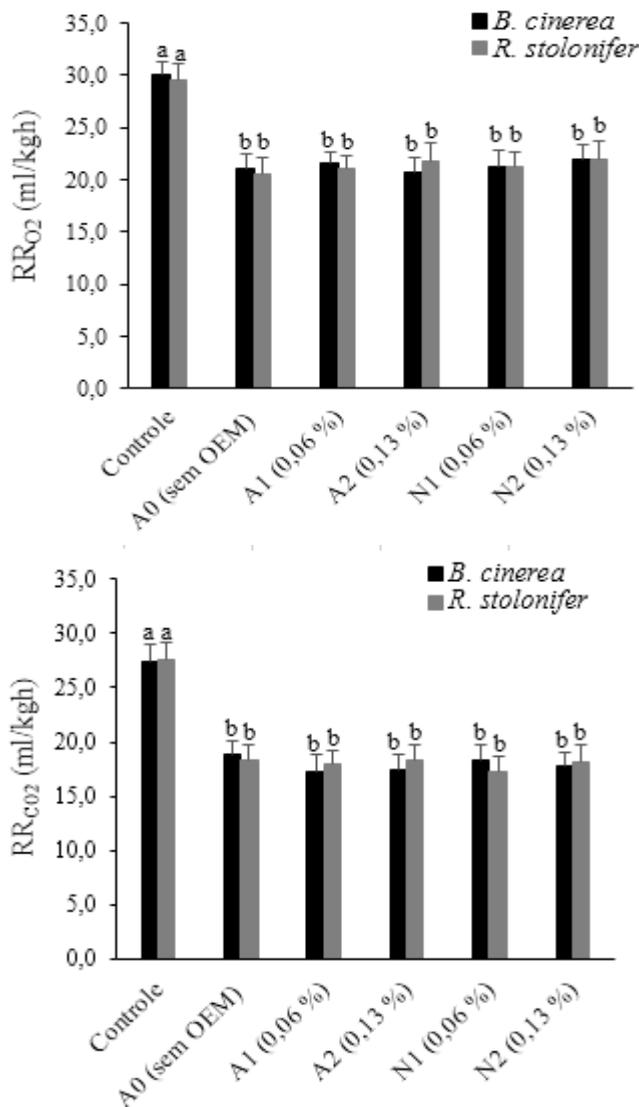
Shahbazi (2018) avaliando o efeito de coberturas comestíveis à base de carboximetilcelulose e quitosana adicionadas de óleo essencial de *Mentha spicata* em morangos, verificou que a taxa de produção de CO₂ dos morangos foi reduzida pelo uso das coberturas comestíveis comparados com morangos controle, armazenados a 4 °C.

Figura 5.3 – Evolução da concentração de O₂ e CO₂ de morangos inoculados sem cobertura e com coberturas, durante 24 h de armazenamento a 15 °C. (■) Controle, (▲) A₀ (sem OEM), (●) A₁ (0,06 %), (×) A₂ (0,13 %), (◆) N₁ (0,06 %) e (■) N₂ (0,13 %). Valores médios e intervalos de 95 % de HSD pelo teste de Tukey.



Fonte: Autor.

Figura 5.4 – Taxa do consumo de O₂ e produção de CO₂ de morangos inoculados sem cobertura e com coberturas, no tempo de 24 h de armazenamento a 15 °C.



Fonte: Autor.

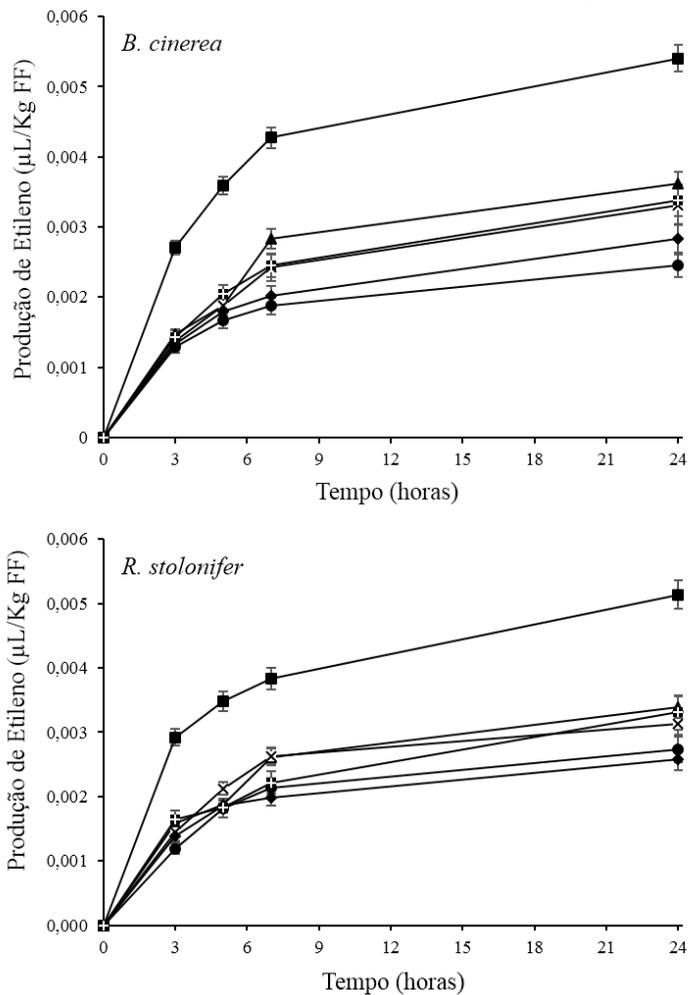
*Letras minúsculas iguais nas colunas para o mesmo parâmetro significam que as amostras não diferem significativamente com base no teste de Tukey ($p > 0,05$).

Produção de Etileno

Por ser um fruto não climatérico, o morango possui baixa produção de etileno após colheita, e alguns estudos relataram que a exposição do fruto ao etileno reduz ainda mais sua vida útil (ZHU e ZHOU, 2007).

O presente estudo mostrou que a produção de etileno aumentou para todos os frutos dos diferentes tratamentos durante as 24 h analisadas (Figura 5.5). No entanto, houve redução da produção de etileno para os frutos com coberturas comparados ao controle, concordando com os resultados da taxa de respiração. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os morangos com cobertura sem óleo e os adicionados de OEM e da NOEM, tanto para o grupo inoculado com *B. cinerea* como para *R. stolonifer*. Assim, o uso de coberturas comestíveis à base de gelatina adicionadas de OEM e NOEM, além de reduzir o desenvolvimento fúngico, mostraram ser eficientes para a redução da produção de etileno e taxa respiratória de morangos armazenados à 15 °C.

Figura 5.5 – Produção de etileno de morangos inoculados sem cobertura e com coberturas, durante 24 h de armazenamento a 15 °C. (■ Controle, ▲ A₀ (sem OEM), ● A₁ (0,06 %), × A₂ (0,13 %), ◆ N₁ (0,06 %) e ■ N₂ (0,13 %)). Valores médios e intervalos de 95 % de HSD pelo teste de Tukey.



Fonte: Autor.

Firmeza

Conforme descrito anteriormente, nessa etapa a firmeza dos morangos foi determinada através do teste de perfuração. Houve redução da firmeza dos morangos inoculados sem e com coberturas comestíveis ao longo do armazenamento à 15 °C e 95 % UR, de acordo com Figura 5.6.

No dia zero, os valores variaram de 1,13 a 1,09 N, para todos os frutos sem e com coberturas, indicando que as coberturas recém aplicadas não influenciaram na firmeza dos morangos, tanto para os frutos inoculados com *B. cinerea* como para os inoculados com *R. stolonifer*. Após 2 dias de armazenamento, ocorreu redução significativa ($p < 0,05$) da força de perfuração dos morangos controle e com cobertura comestível sem óleo (A_0), quando comparados aos frutos revestidos das coberturas contendo óleo essencial, variando de 1,05 a 0,86 N, para os dois grupos de morangos inoculados.

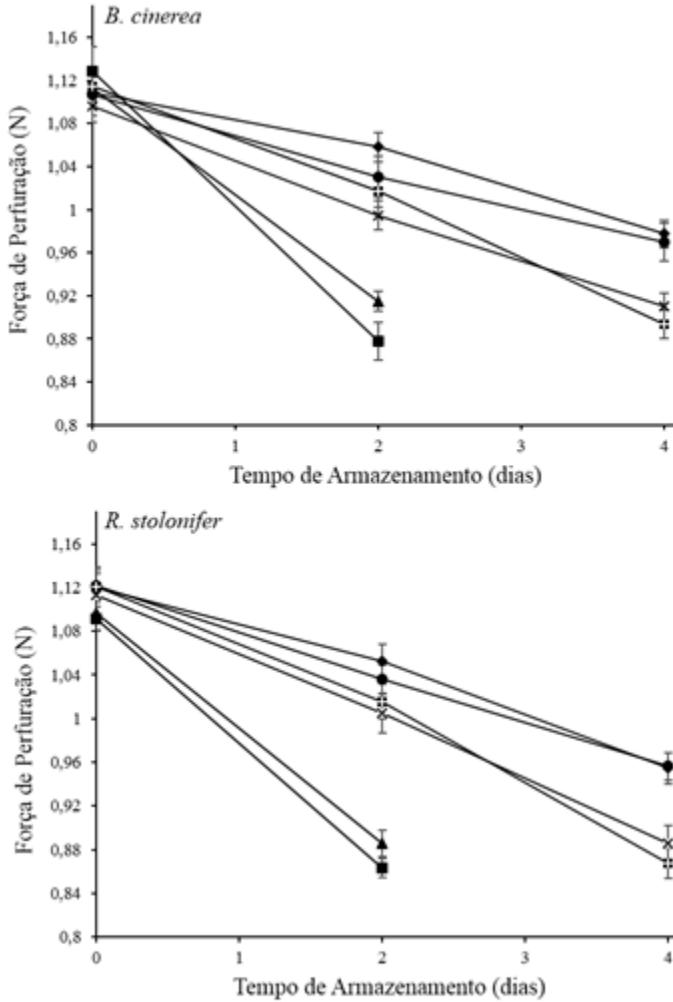
No 4 ° dia de armazenamento não foi possível avaliar a firmeza dos morangos controle e os com cobertura comestível sem óleo, tanto para o grupo inoculado com *B. cinerea* como para o grupo inoculado com *R. stolonifer*, pois os frutos desses grupos apresentavam mais de 50 % de desenvolvimento fúngico. Os morangos aplicados das coberturas com OEM e com NOEM, a força de perfuração dos grupos variaram de 0,98 a 0,87 N. No entanto, as coberturas comestíveis adicionadas da maior concentração de óleo de menta (A_2 e N_2) aplicadas nos morangos causaram maior redução ($p < 0,05$) nos valores da força de perfuração quando comparadas as coberturas de menor concentração (A_1 e N_1), indicando que a concentração de 0,13 % de óleo de menta pode ter prejudicado a estrutura da parede celular dos morangos, causando amolecimento do fruto ao final do 4 ° dias de armazenamento.

A perda da firmeza dos morangos podem ser atribuídas às mudanças que ocorrem na estrutura dos tecidos celulares do fruto durante seu amadurecimento e senescência, que podem estar relacionadas a perda de água e ao desenvolvimento fúngico (CHIRALT et al., 2001). Logo, um efeito benéfico foi observado quanto ao uso de coberturas comestíveis à base de gelatina adicionadas de OEM e de NOEM contendo 0,06 % de óleo de menta na formulação, tanto para a firmeza, quanto para o desenvolvimento fúngico e a taxa de respiração dos morangos armazenados a 15 °C.

Resultados semelhantes foram observados por Ventura-Aguilar et al. (2018) utilizando coberturas comestíveis à base de quitosana adicionadas de óleo essencial de canela e extrato de flor de hibisco aplicadas em morangos inoculados. Os autores relataram que os morangos com as coberturas comestíveis adicionadas de óleo e do extrato foram mais firmes com relação aos morangos do grupo controle, armazenados à 20 °C.

Perdones et al. (2012) relataram que o óleo essencial de limão adicionado nas coberturas comestíveis de quitosana não promoveu nenhum benefício com relação a firmeza dos morangos armazenados à 4 °C.

Figura 5.6 – Força de perfuração de morangos inoculados sem cobertura e com coberturas armazenados a 15 °C e 95 % UR. (■ Controle, ▲ A₀ (sem OEM), ● A₁ (0,06 %), × A₂ (0,13 %), ◆ N₁ (0,06 %) e ▣ N₂ (0,13 %)). Valores médios e intervalos de 95 % de HSD pelo teste de Tukey.



Fonte: Autor.

5.3.2 Revestimento de morangos sanitizados por luz UV-C

Os resultados da etapa anterior, para coberturas comestíveis à base de gelatina contendo OEM e NOEM aplicadas em morangos inoculados com *B. cinerea* e *R. stolonifer*, armazenados a 15 °C e 95 % UR, mostraram que acima de 0,25 % de óleo de menta nas formulações de coberturas comestíveis provocaram a queima do tecido dos morangos, escurecimento e amolecimento dos frutos. O estudo também mostrou que nas concentrações de 0,06 % e 0,13 % de óleo de menta nas formulações das coberturas de gelatina apresentaram efeitos positivos quanto a redução do desenvolvimento dos fungos, e redução da taxa de respiração e menor produção de etileno dos morangos. Porém 0,13 % de óleo nas coberturas, tanto com OEM quanto com NOEM, reduziram a firmeza dos morangos quando comparados aos frutos com coberturas comestíveis com concentrações de 0,06 % de óleo na formulação.

Com base nos resultados avaliados na primeira etapa deste capítulo e também através dos resultados obtidos nos capítulos 3 e 4, a formulação da cobertura escolhida para o estudo da vida útil de morangos foi a A₁ com 0,06 % de OEM. Essa formulação não apresentou diferenças significativas com relação a formulação N₁ (0,06 %) nas etapas de caracterização dos filmes nos capítulos 3 e 4, e com isso sua escolha baseou-se por utilizar técnica de baixo custo de produção, por reduzir o desenvolvimento fúngico dos morangos, reduzir a taxa de respiração e menor produção de etileno do fruto, além de ser mais compatível com a superfície dos morangos, mantendo melhor sua firmeza até 4 dias de armazenamento à 15 °C e 95 % UR.

Nesta etapa foi avaliada a qualidade físico-química de morangos higienizados com luz UV-C e aplicados de cobertura comestível à base de gelatina sem óleo e com 0,06 % de OEM, armazenados à 6 °C e 95 % UR.

Desenvolvimento Fúngico Visual

Na Figura 5.7 estão mostrados os resultados do desenvolvimento fúngico dos morangos sem e com coberturas comestíveis em que o tempo de armazenamento dos frutos foi afetado pelos tratamentos. Os frutos controle (sem aplicação de UV-C e sem cobertura) estavam aptos para o consumo de 4 dias, 6 dias para morangos do grupo UVC (com aplicação de UV-C e sem cobertura), 6 dias para os morangos do grupo A₀ (com

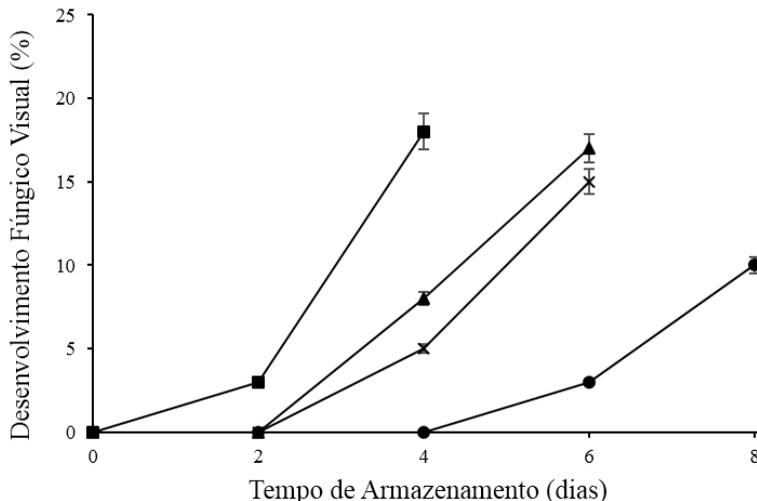
aplicação de UV-C e cobertura sem OEM) e de 8 dias para o grupo A₁ (com aplicação de UV-C e com cobertura com 0,06 % de OEM).

O desenvolvimento fúngico dos morangos com cobertura A₁ foi significativamente menor ($p < 0,05$) quando comparado com os morangos controle, UVC e A₀, durante o armazenamento a 6 °C. O desenvolvimento fúngico foi maior para os morangos controle, variando de 3 a 18 %. Os morangos higienizados com UVC apresentaram de 8 a 17 % de desenvolvimento fúngico, os morangos com cobertura comestível A₀, de 5 a 15 % da presença de fungos, e os morangos com cobertura comestível A₁ variaram de 3 a 10 % da presença de fungos.

A eficácia antifúngica do OEM foi comprovada nesse trabalho através da inibição do desenvolvimento dos fungos de *B. cinerea* e *R. stolonifer*. A sanitização dos frutos com luz UV-C não alterou o resultado, uma vez que os frutos sanitizado e sem a presença do óleo foi menos eficaz.

Resultados semelhantes foram relatados para morangos revestidos com quitosana adicionada de óleo essencial de limão, em que o desenvolvimento dos fungos em morangos foi menor pelo uso do revestimento quando comparados aos frutos com revestimento sem óleo e com os frutos controle (PERDONES et al., 2012).

Figura 5.7 – Desenvolvimento fúngico de morangos sem e com cobertura à base de gelatina e OEM, armazenados a 6 °C e 95 % UR. (—■— Controle, —▲— UVC (sem cobertura), —×— A₀ (sem OEM), —●— A₁ (0,06 % OEM)). Valores médios e intervalos de 95 % de HSD pelo teste de Tukey.



Fonte: Autor.

Perda de Massa

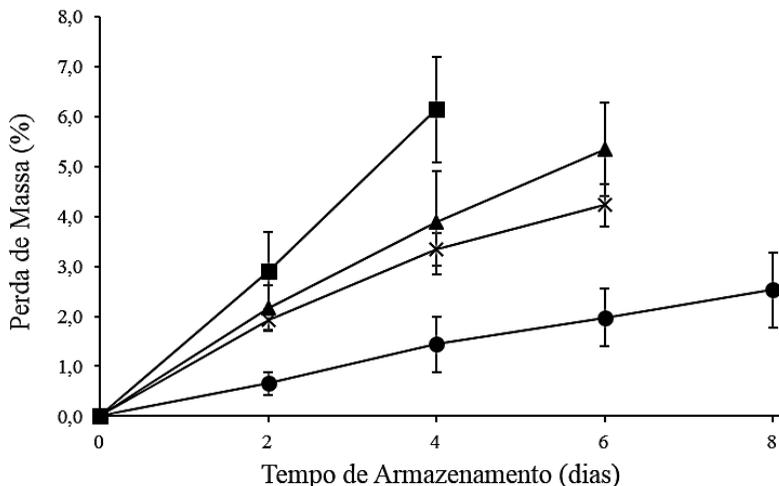
A perda de massa serve como indicador do frescor da fruta que ocorre pela perda de água devido à transpiração e perda de reservas de carbono como resultado da respiração (HAJJI et al., 2018). As perdas de massas (%) dos grupos dos morangos sem cobertura e com coberturas comestíveis estão representadas através na Figura 5.8. A perda de massa dos morangos aumentou significativamente ($p < 0,05$) para todos os tratamentos durante o armazenamento à 6 °C e 95 % UR, mas para as amostras A₁, foi significativamente ($p < 0,05$) menor do que para os frutos dos tratamentos controle, UVC e A₀. Os valores altos da perda de massa dos morangos controle, UVC e A₀ na fase final do armazenamento, pode ser explicado pelo aumento do desenvolvimento fúngico e atividade metabólica, como relatado anteriormente, levando a degradação mais rápida desses frutos.

Foi observado efeito benéfico do uso de cobertura comestível com OEM para evitar a perda de massa dos morangos (máxim de 2,5 %),

indicando que esse revestimento agiu como barreira semipermeável contra a perda de água do fruto para o meio externo (OREGEL-ZAMUDIO et al. 2017). O OEM aumentou a hidrofobicidade da cobertura comestível de gelatina através dos resultados de ângulo de contato da água e da PVA dos filmes, como relatado no capítulo 3. Assim, pode-se explicar a tendência na redução da perda de massa dos morangos com cobertura comestível com óleo de menta A₁ ao longo do armazenamento quando comparado aos outros tratamentos.

Efeitos positivos na redução da perda de massa de morangos aplicados de revestimentos comestíveis adicionados de diferentes óleos essenciais também foram relatados por Shahbazi (2018), Dong e Wang (2017), Sangsuwan et al. (2016) e Paretto et al. (2014).

Figura 5.8 – Perda de massa de morangos sem e com cobertura à base de gelatina e OEM, armazenados à 6 °C e 95 % UR. (■ Controle, ▲ UVC (sem cobertura), × A₀ (sem OEM), ● A₁ (0,06 % OEM)). Valores médios e intervalos de 95 % de HSD pelo teste de Tukey.



Fonte: Autor.

Cor

A cor das frutas deve ter o padrão percebido pelo consumidor como referência para aquele produto. A quantificação da cor dos

morangos sem e com coberturas comestíveis à base de gelatina em função do tempo de armazenamento estão apresentadas através da Tabela 5.1. A coordenada L^* , que mostra o brilho dos morangos, diminuiu com o tempo de armazenamento sem e com coberturas comestíveis. Porém, os morangos com cobertura sem e com óleo (A_0 e A_1) preservaram o brilho dos frutos quando comparado aos resultados padronizados no 1º dia sem e com cobertura. Esse resultado está relacionado com a perda de umidade da superfície das amostras com conseqüente escurecimento. Os resultados de transparência e opacidade dessa formulação de filme com 0,06 % de OEM, avaliada no capítulo 3, não interferiram no parâmetro luminosidade dos morangos após serem aplicados dessa cobertura comestível.

Os valores que representam a cor vermelha reduziram ao longo do tempo analisado, conforme mostra o parâmetro a^* , dos morangos controle, UVC e A_0 . Já os morangos aplicados da cobertura comestível com OEM (A_1) não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) com o tempo de armazenamento, a cor vermelha foi mantida até o 8º dia. Resultados semelhantes foram mostrados por Duran et al. (2016) em que a cor dos morangos com coberturas à base de quitosana, nisina e extrato de semente de uva não diferiram com relação a cor dos morangos controle armazenados a 4 °C.

Os valores de b^* , que mostra a tendência a cor amarela, também diminuíram com o tempo de armazenamento de todas as amostras, sendo mais pronunciada para os frutos controle e UVC, e isso pode ser atribuído à perda de pigmentos amarelos causados pelo amadurecimento dos morangos (SHIN et al., 2012). As amostras com coberturas A_0 e A_1 não apresentaram diferença significativa do parâmetro b^* ao longo do armazenamento e em relação ao controle, no dia 1º.

Os resultados de L^* , a^* e b^* sugerem que as coberturas comestíveis sem óleo e com OEM (A_1) mantiveram a cor padrão dos morangos em relação ao padronizado no 1º dia de armazenamento.

Tabela 5.1 – Cor de morangos sem e com cobertura à base de gelatina e OEM, armazenados a 6 °C e 95 % UR.

Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)				
	0	2	4	6	8
Controle	35,0 ± 2,2 ^{aA}	33,0 ± 2,2 ^{aAB}	32,2 ± 2,2 ^{aB}	-	-
UVC (sem cobertura)	35,1 ± 2,4 ^{aA}	33,0 ± 2,3 ^{aB}	32,0 ± 2,1 ^{aB}	31,0 ± 2,0 ^{aB}	-
A ₀ (sem OEM)	39,0 ± 2,0 ^{bA}	36,2 ± 2,0 ^{bB}	35,0 ± 2,0 ^{bBC}	34,0 ± 2,0 ^{bC}	-
A ₁ (0,06 % OEM)	39,1 ± 1,4 ^{bA}	37,4 ± 2,3 ^{bA}	35,0 ± 2,1 ^{bB}	34,0 ± 2,0 ^{bB}	34,0 ± 2,3 ^B
		L*			
Controle	51,0 ± 2,0 ^{aA}	50,0 ± 2,0 ^{abAB}	48,2 ± 2,4 ^{aB}	-	-
UVC (sem cobertura)	51,4 ± 2,0 ^{aA}	49,0 ± 2,0 ^{bB}	49,1 ± 1,2 ^{abB}	48,0 ± 2,0 ^{aB}	-
A ₀ (sem OEM)	52,0 ± 1,4 ^{aA}	51,0 ± 1,3 ^{aAB}	49,0 ± 2,2 ^{aBC}	50,0 ± 1,3 ^{bC}	-
A ₁ (0,06 % OEM)	52,0 ± 2,0 ^{aA}	51,2 ± 2,4 ^{aA}	51,2 ± 2,1 ^{bA}	51,0 ± 2,0 ^{bA}	50,0 ± 2,0 ^A
		b*			
Controle	33,3 ± 2,0 ^{aA}	31,0 ± 1,4 ^{aB}	30,4 ± 2,0 ^{aB}	-	-
UVC (sem cobertura)	34,0 ± 2,0 ^{aA}	31,3 ± 2,3 ^{aAB}	31,0 ± 2,2 ^{aB}	30,2 ± 2,0 ^{aB}	-
A ₀ (sem OEM)	33,0 ± 2,0 ^{aA}	32,3 ± 2,0 ^{aA}	31,3 ± 2,0 ^{aA}	31,2 ± 2,0 ^{aA}	-
A ₁ (0,06 % OEM)	33,0 ± 2,2 ^{aA}	33,0 ± 2,0 ^{aA}	32,0 ± 2,3 ^{aA}	32,0 ± 2,0 ^{aA}	32,0 ± 2,0 ^A

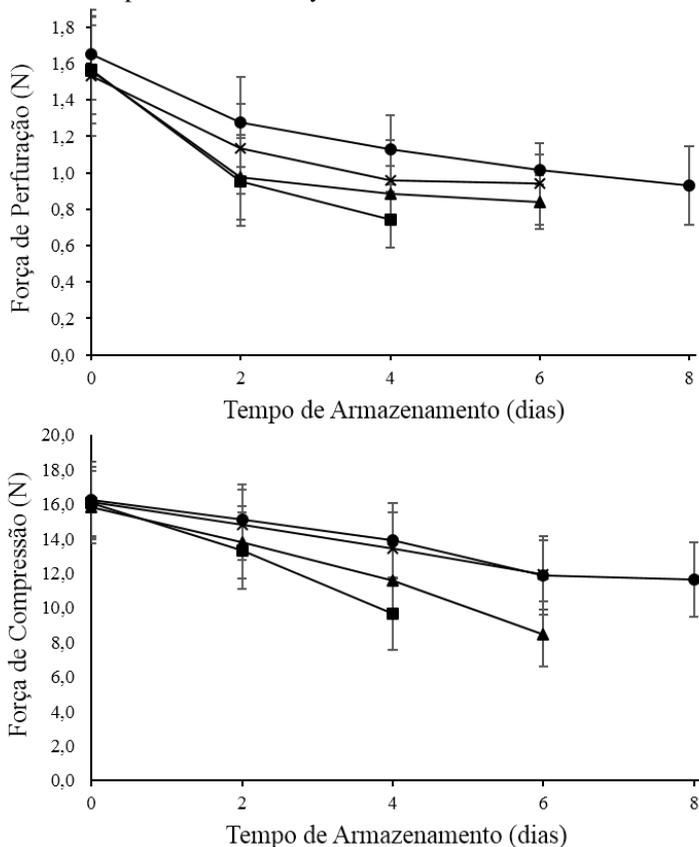
*Letras minúsculas iguais nas colunas e letras maiúsculas iguais na mesma linha para o mesmo parâmetro significam que as amostras não diferem significativamente com base no teste de Tukey ($p > 0,05$). (-) dados não registrados, qualidade do morango não apta para análise.

Firmeza

A firmeza é um parâmetro de qualidade muito importante para frutos porque indica mudanças na estrutura do tecido celular, fazendo com que a força da parede celular do fruto se tornem enfraquecidas (VELICKOVA et al., 2013; TOIVONEN e BRUMMELL, 2008). A firmeza dos morangos sem e com coberturas (Figura 5.9) foram determinadas através dos testes de perfuração e de compressão (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011). No tempo zero, a firmeza dos morangos dos diferentes tratamentos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre si para ambas as análises (força de perfuração e força de compressão). Ao longo do armazenamento os frutos apresentaram redução da força de perfuração e de compressão, sendo mais pronunciadas para os morangos do grupo controle e UVC. Essas alterações podem ser atribuídas à maior perda de massa e desenvolvimento dos fungos, acelerando a senescência dos frutos sem cobertura comestível. A firmeza dos morangos com cobertura comestível A_0 e A_1 não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre si com os dias de armazenamento, indicando que o OEM na cobertura comestível na concentração utilizada não interferiu na redução da firmeza dos morangos. A firmeza dos morangos foi menos afetada para os frutos que apresentaram menor desenvolvimento fúngico e menor perda de massa, como podem ser observadas através das Figuras 5.7 e 5.8.

Resultados contrários foram relatados por Duran et al. (2016), Perdonés et al. (2012) em que a firmeza dos morangos aplicados das diferentes coberturas comestíveis não apresentaram diferença com relação aos frutos controle.

Figura 5.9 – Firmeza de morangos sem e com cobertura à base de gelatina e OEM, armazenados a 6 °C e 95 % UR. (■ Controle, ▲ UVC (sem cobertura), ✕ A₀ (sem OEM), ● A₁ (0,06 % OEM). Valores médios e intervalos de 95 % de HSD pelo teste de Tukey.



Fonte: Autor.

Taxa de Respiração

O consumo de O₂ e produção de CO₂ dos morangos aumentaram durante seu armazenamento, relacionando isso às condições de estresse no pós-colheita, como a falta de nutrientes, perda de água e desenvolvimento de fungos (PERDONES et al., 2012; VENTURA-

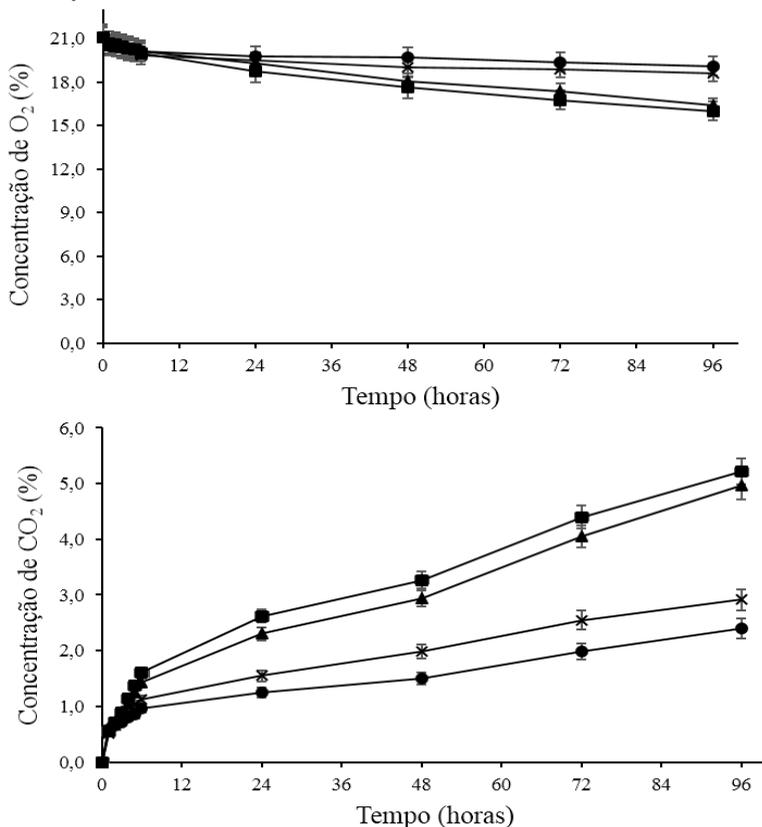
AGUILAR et al., 2018; ARAQUE et al., 2018). Na Figura 5.10 estão representados as concentrações de O₂ e CO₂ dos morangos dos diferentes tratamentos e a Figura 5.11 representa as taxas de respiração, obtida pelas equações 4 e 5, a partir dos dados da concentração de O₂ e CO₂. A temperatura de armazenamento de 6 °C contribuiu para a redução do metabolismo dos frutos, sendo um dos fatores fundamentais para a redução das concentrações de O₂ e CO₂ e da taxa de respiração dos morangos dos diferentes tratamentos. Além disso, foi observado que nas últimas horas de armazenamento dos morangos a concentração de O₂ diminuiu significativamente ($p < 0,05$) e a concentração de CO₂ aumentou para todos os tratamentos. Entretanto, os morangos sem cobertura comestível (controle e UVC) apresentaram concentrações menores ($p < 0,05$) de O₂ com relação aos morangos com cobertura comestível à base de gelatina e OEM (A₀ e A₁) no tempo de 96 h de armazenamento. Essa mesma relação foi observada para os níveis de CO₂, onde os frutos sem revestimentos apresentaram as maiores concentrações ($p < 0,05$) comparados aos morangos revestidos para o mesmo tempo de 96 h. Isso mostrou que as coberturas comestíveis à base de gelatina controlaram as trocas dos gases (O₂ e CO₂) entre os morangos e o ambiente, e não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras contendo revestimentos sem óleo e com OEM (A₀ e A₁).

No tempo de 96 h estabelecido para determinação das taxas do consumo de O₂ e produção de CO₂ dos morangos (Figura 5.10), pela ANOVA observa-se que as coberturas comestíveis A₀ (sem OEM) e A₁ (0,06 % OEM) afetaram diretamente ($p < 0,05$) as taxas de respiração dos morangos quando comparadas com as taxas de respiração das amostras controle e UVC, estando de acordo com os resultados obtidos para as concentrações dos gases. Algumas pesquisas apontaram que o uso de óleos essenciais em revestimentos promoveram o aumento da taxa de respiração dos morangos (PERDONES et al., 2012; SANGSUWAN et al., 2016; VENTURA-AGUILAR et al., 2018). Esses autores explicaram que os óleos essenciais nas coberturas comestíveis podem afetar o metabolismo dos morangos e modificar, dessa forma, seu comportamento respiratório, o que não foi observado no presente estudo.

Os resultados obtidos mostraram que coberturas comestíveis à base de gelatina podem reduzir a respiração de morangos e que o OEM na concentração de 0,06 % não afetou o metabolismo dos frutos. Além disso, sabe-se que o armazenamento a baixas temperaturas, higienização por luz UV-C e aplicação de coberturas comestíveis são tecnologias que podem retardar o desenvolvimento fúngico, e com isso diminuir o

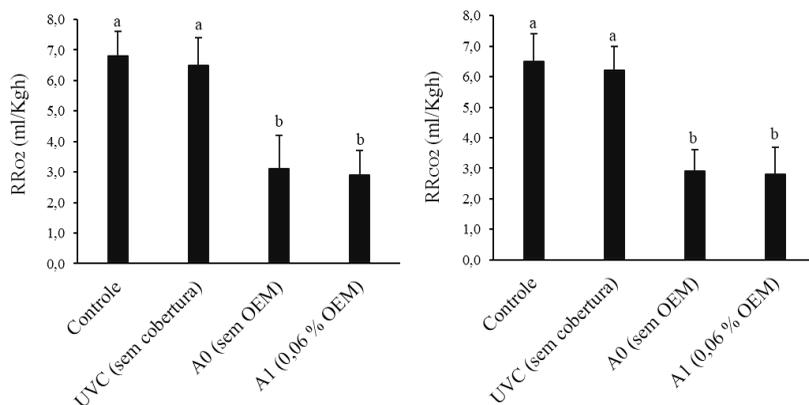
processo de respiração de morangos estendendo seu tempo de vida útil (VELICKOVA et al., 2013; COTE et al., 2013; VALENZUELA et al., 2015).

Figura 5.10 – Evolução da concentração de O_2 e CO_2 de morangos sem e com cobertura à base de gelatina e OEM, durante 96 h de armazenamento a 6 °C e 95 % UR. (—■— Controle, —▲— UVC (sem cobertura), —×— A_0 (sem OEM), —●— A_1 (0,06 % OEM)). Valores médios e intervalos de 95 % de HSD pelo teste de Tukey.



Fonte: Autor.

Figura 5.11 – Taxa do consumo de O₂ e produção de CO₂ de morangos sem e com cobertura à base de gelatina e OEM, no tempo de 96 h de armazenamento a 6 °C e 95 % UR.



Fonte: Autor.

*Letras minúsculas iguais nas colunas para o mesmo parâmetro significam que as amostras não diferem significativamente com base no teste de Tukey ($p > 0,05$).

pH e Sólidos Solúveis Totais (SST)

Os valores de pH e SST dos morangos sem cobertura e com coberturas estão apresentados através da Tabela 5.2. Assim como a taxa de respiração e firmeza, esses parâmetros estão relacionados com a senescência dos frutos (Duran et al., 2016). Foi observado redução significativa ($p < 0,05$) nos valores do pH dos morangos sem e com coberturas comestíveis com os dias de armazenamento a 6 °C, sendo menor redução do pH dos morangos com cobertura comestível com OEM (A₁). Os resultados do pH estão de acordo com o aumento nos valores dos ácidos orgânicos dos morangos dos diferentes tratamentos com o tempo de armazenamento a 6 °C (Tabela 5.4). De acordo com Famiani et al. 2015, os ácidos orgânicos presentes em frutos maduros favorecem consideravelmente para seu sabor, sendo que cada cultivar tem seu mecanismos próprio e podem usar diferentes vias metabólicas que determinam essas mudanças, como o aumento dos ácidos orgânicos ter relação na diminuição do pH dos morangos dos diferentes tratamentos no presente estudo. Velickova et al. (2013) e Oregel-Zamudio et al. (2017) estudando morangos com coberturas comestíveis à base de quitosana e

cera de candelaria, respectivamente, relataram a diminuição nos valores de pH dos frutos com o tempo de armazenamento à temperatura ambiente.

Os SST dos morangos de todos os tratamentos apresentaram reduções significativas ($p < 0,05$) com o tempo de armazenamento (Tabela 5.2). Os morangos com cobertura comestível contendo OEM (A_1) apresentaram menores ($p < 0,05$) variações nos valores de SST, a partir do 2^o dia de armazenamento, quando comparados aos frutos controle, UVC e A_0 , indicando que a hidrólise da sacarose para manter a atividade fisiológica foi mais rápida para essas amostras do que para os morangos com cobertura comestível A_1 (ADAY e CANER, 2013). Além disso, a menor percentagem de desenvolvimento fúngico pode inibir o fungo de consumir mais açúcares do fruto (VELICKOVA et al., 2013).

Alguns autores relataram que os óleos essenciais quando adicionados em coberturas comestíveis podem interagir com a membrana celular do morango e afetar sua via metabólica, causando a senescência (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011). No presente estudo o OEM utilizado na concentração de 0,06 % não afetou as propriedades metabólicas dos morangos como pode ser observado através da taxa de respiração para as amostras contendo cobertura A_1 .

Tabela 5.2 – pH e Sólidos Solúveis Totais (SST) de morangos sem e com cobertura à base de gelatina e OEM, armazenados a 6 °C e 95 % UR.

Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)			
	0	2	4	8
	pH			
Controle	3,40 ± 0,01 ^{aA}	3,36 ± 0,01 ^{aB}	3,28 ± 0,01 ^{aC}	-
UVC (sem cobertura)	3,40 ± 0,01 ^{aA}	3,37 ± 0,01 ^{bB}	3,34 ± 0,00 ^{bC}	3,28 ± 0,01 ^{aD}
A ₀ (sem OEM)	3,40 ± 0,01 ^{aA}	3,39 ± 0,01 ^{cB}	3,37 ± 0,00 ^{cC}	3,29 ± 0,01 ^{aD}
A ₁ (0,06 % OEM)	3,40 ± 0,01 ^{aA}	3,39 ± 0,01 ^{cA}	3,36 ± 0,01 ^{eB}	3,34 ± 0,01 ^{bC}
	SST (°Brix)			
Controle	7,25 ± 0,08 ^{aA}	6,83 ± 0,04 ^{aB}	6,45 ± 0,05 ^{aC}	-
UVC (sem cobertura)	7,25 ± 0,05 ^{aA}	7,08 ± 0,08 ^{bB}	6,85 ± 0,05 ^{bC}	6,63 ± 0,05 ^{aD}
A ₀ (sem OEM)	7,25 ± 0,05 ^{aA}	7,07 ± 0,05 ^{bB}	6,88 ± 0,08 ^{bC}	6,52 ± 0,04 ^{bD}
A ₁ (0,06 % OEM)	7,25 ± 0,05 ^{aA}	7,22 ± 0,08 ^{cA}	7,07 ± 0,08 ^{eB}	6,93 ± 0,05 ^{cC}

*Letras minúsculas iguais nas colunas e letras maiúsculas iguais na mesma linha para o mesmo parâmetro significam que as amostras não diferem significativamente com base no teste de Tukey ($p > 0,05$). (-) dados não registrados, qualidade do morango não apta para análise.

Açúcares e Ácidos Orgânicos

Tanto os açúcares como os ácidos orgânicos são compostos que contribuem para a qualidade sensorial de diversas frutas, principalmente no sabor de morangos. Na Tabela 5.3 estão apresentados os resultados da quantificação dos açúcares simples e dos ácidos orgânicos dos morangos dos diferentes tratamentos. Com relação aos açúcares, a glicose e a frutose foram predominantes, e a sacarose foi o açúcar presente em menor proporção. Todos os açúcares mostraram redução significativa ($p < 0,05$) com o tempo de armazenamento dos morangos sem e com coberturas. Os frutos com cobertura comestível contendo OEM (A_1) houve menor redução ($p < 0,05$) no teor de todos os açúcares quando comparados com os frutos dos demais tratamentos. Esses resultados concordam com o teor de SST apresentados anteriormente. A menor perda de massa pode influenciar no aumento da concentração de açúcares e a menor porcentagem no desenvolvimento fúngico podem inibir maior consumo dos açúcares pelos fungos, relação observada na presente pesquisa.

O ácido cítrico é considerado o principal ácido orgânico que se concentra em morangos maduros, e seu acúmulo pode estar relacionado com o tipo da cultivar e suas diferentes vias metabólicas. Durante a maior parte do desenvolvimento e amadurecimento de diferentes frutos o teor dos ácidos orgânicos costuma aumentar nas polpas dos frutos (FAMIANI et al., 2015). Nesse estudo, observou-se que o teor dos ácidos cítrico e málico aumentaram com os dias de armazenamento dos morangos sem e com coberturas comestíveis, corroborando com a redução nos valores do pH para as amostras de morangos dos diferentes tratamentos (Tabela 5.2). O uso da cobertura comestível com OEM (A_1) em morangos mostrou ser o tratamento com menores variações ($p < 0,05$) nos teores dos ácidos cítrico e málico, a partir do 4^o e 6^o dias de armazenamento, respectivamente, quando comparado com os frutos controle, UVC e com cobertura sem óleo (A_0), corroborando com os resultados de perda de massa, desenvolvimento fúngico, taxa de respiração, pH e SST.

Resultados semelhantes foram relatados por Caleb et al. (2016) com relação aos açúcares de morangos mergulhados em água quente, e resultados opostos foram observados por Khalifa et al. (2016) com relação aos ácidos orgânicos (ácido ascórbico) em que os valores reduziram com o tempo de armazenamento a 4 °C de morangos sem e com cobertura comestível à base de quitosana.

Tabela 5.3 – Açúcares e ácidos orgânicos de morangos sem e com cobertura à base de gelatina e OEM, armazenados à 6 °C e 95 % UR.

Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)			
	0	4	6	8
	Frutose (mg/g FF)			
Controle	3,27 ± 0,03 ^{aA}	2,85 ± 0,04 ^{aB}	-	-
UVC (sem cobertura)	3,26 ± 0,03 ^{aA}	3,01 ± 0,04 ^{bB}	2,95 ± 0,04 ^{aB}	-
A ₀ (sem OEM)	3,26 ± 0,04 ^{aA}	3,09 ± 0,03 ^{cB}	3,02 ± 0,03 ^{abC}	-
A ₁ (0,06 % OEM)	3,26 ± 0,04 ^{aA}	3,12 ± 0,03 ^{cB}	3,03 ± 0,04 ^{bC}	3,01 ± 0,03 ^C
	Glicose (mg/g FF)			
Controle	2,64 ± 0,03 ^{aA}	2,28 ± 0,05 ^{aB}	-	-
UVC (sem cobertura)	2,64 ± 0,03 ^{aA}	2,33 ± 0,03 ^{aB}	2,26 ± 0,04 ^{aC}	-
A ₀ (sem OEM)	2,64 ± 0,03 ^{aA}	2,39 ± 0,05 ^{abB}	2,29 ± 0,06 ^{aC}	-
A ₁ (0,06 % OEM)	2,64 ± 0,02 ^{aA}	2,49 ± 0,09 ^{bB}	2,43 ± 0,07 ^{bB}	2,40 ± 0,05 ^B
	Sacarose (mg/g FF)			
Controle	0,85 ± 0,04 ^{aA}	0,54 ± 0,06 ^{aB}	-	-
UVC (sem cobertura)	0,84 ± 0,03 ^{aA}	0,63 ± 0,04 ^{abB}	0,06 ± 0,05 ^{aB}	-
A ₀ (sem OEM)	0,85 ± 0,02 ^{aA}	0,71 ± 0,05 ^{bcB}	0,56 ± 0,05 ^{aC}	-
A ₁ (0,06 % OEM)	0,84 ± 0,06 ^{aA}	0,80 ± 0,02 ^{cA}	0,76 ± 0,05 ^{bAB}	0,66 ± 0,05 ^B
	Ácido cítrico (mg/g FF)			
Controle	6,78 ± 0,04 ^{aA}	7,06 ± 0,05 ^{aB}	-	-
UVC (sem cobertura)	6,79 ± 0,03 ^{aA}	6,94 ± 0,04 ^{bB}	7,00 ± 0,04 ^{aB}	-
A ₀ (sem OEM)	6,78 ± 0,04 ^{aA}	6,82 ± 0,02 ^{cA}	6,98 ± 0,03 ^{aB}	-
A ₁ (0,06 % OEM)	6,78 ± 0,04 ^{aA}	6,80 ± 0,04 ^{cA}	6,84 ± 0,03 ^{bAB}	6,90 ± 0,03 ^B

Ácido málico (mg/g FF)

Controle	0,74 ± 0,02 _{aA}	1,00 ± 0,03 _{aB}	-
UVC (sem cobertura)	0,73 ± 0,02 _{aA}	0,76 ± 0,02 _{bA}	0,98 ± 0,03 _{aB}
A ₀ (sem OEM)	0,73 ± 0,04 _{aA}	0,72 ± 0,03 _{bA}	0,94 ± 0,03 _{aB}
A ₁ (0,06 % OEM)	0,72 ± 0,02 _{aA}	0,71 ± 0,04 _{bA}	0,80 ± 0,03 _{bB}
			0,92 ± 0,02 _c

*Letras minúsculas iguais nas colunas e letras maiúsculas iguais na mesma linha para o mesmo parâmetro significam que as amostras não diferem significativamente com base no teste de Tukey ($p > 0,05$). (-) dados não registrados, qualidade do morango não apta para análise.

Capacidade Antioxidante e Compostos Fenólicos Totais

A capacidade antioxidante e os compostos fenólicos totais foram avaliados como indicativos das propriedades funcionais dos morangos (VENTURA-AGUILAR et al., 2018) e os resultados estão apresentados através da Tabela 5.4.

A capacidade antioxidante dos morangos controle diminuiu ($p < 0,05$) com o tempo de armazenamento à 6 °C. Para as amostras dos tratamentos UVC, A₀ e A₁ a capacidade antioxidante, tanto pela técnica de captura do radical ABTS como DPPH, não apresentou variação significativa ($p > 0,05$) com os dias de armazenamento. Os morangos dos diferentes tratamentos, também não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre si. Ventura-Aguilar et al. (2018) observaram a redução da capacidade antioxidante de morangos controle e com coberturas comestíveis à base de quitosana e óleo essencial de canela e extrato aquoso de Roselle com o tempo de armazenamento à 5 e 20 °C. Eles explicaram que essa redução da capacidade antioxidante pode estar associada ao processo de senescência dos frutos, mas que o uso das coberturas comestíveis foram capazes de manter a qualidade dos frutos por apresentarem maiores valores de capacidade antioxidante quando comparados aos frutos controle. No presente estudo, foi observado o mesmo comportamento, em que os morangos com cobertura comestível A₁ apresentaram valores da capacidade antioxidante maiores ao final do armazenamento comparado às amostras controle, UVC e A₀.

Foi observado redução significativa ($p < 0,05$) do conteúdo dos compostos fenólicos totais com o tempo de armazenamento dos morangos controle. Os frutos tratados com UVC e com coberturas A₀ e A₁ não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) do teor de compostos fenólicos durante o armazenamento. No 4º dia de armazenamento foi possível observar diferença ($p < 0,05$) nos valores dos compostos fenólicos totais dos morangos com cobertura comestível (A₀ e A₁) com relação aos morangos controle, indicando que coberturas comestíveis à base de gelatina podem formar uma barreira protetora na superfície da fruta, reduzindo o suprimento de O₂ e evitando a oxidação enzimática de compostos fenólicos. Resultados semelhantes aos obtidos por Wang e Gao (2013).

Outros estudos foram encontrados sobre o efeito de coberturas comestíveis na capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais de morangos (DONG e WANG (2017); KHALIFA et al., 2016; PARETTO

et al., 2014; WANG e GAO, 2013; GOL, PATEL e RAO, 2013). Portanto o uso de coberturas comestíveis à base de gelatina com OEM, não só pode aumentar a vida útil de morangos, como pode ser considerada uma tecnologia adequada para preservar a capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais de morangos armazenados a 6 °C.

Tabela 5.4 – Capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais de morangos sem e com cobertura à base de gelatina e OEM, armazenados à 6 °C e 95 % UR.

Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)				
	0	2	4	6	8
Capacidade antioxidante por ABTS (mg/g FF)					
Controle	2,15 ± 0,2 _{aA}	2,08 ± 0,2 _{aA}	1,67 ± 0,2 _{aB}	-	-
UVC (sem cobertura)	2,16 ± 0,2 _{aA}	2,13 ± 0,2 _{aA}	1,82 ± 0,2 _{aA}	1,71 ± 0,2 _{aA}	-
A ₀ (sem OEM)	2,15 ± 0,2 _{aA}	2,12 ± 0,2 _{aA}	1,96 ± 0,2 _{aA}	1,77 ± 0,2 _{aA}	-
A ₁ (0,06 % OEM)	2,16 ± 0,2 _{aA}	2,14 ± 0,1 _{aA}	1,92 ± 0,2 _{aA}	1,80 ± 0,2 _{aA}	1,78 ± 0,1 _A
Capacidade antioxidante por DPPH (mg/g FF)					
Controle	3,22 ± 0,2 _{aA}	3,17 ± 0,1 _{aA}	2,84 ± 0,1 _{aB}	-	-
UVC (sem cobertura)	3,21 ± 0,2 _{aA}	3,19 ± 0,1 _{aA}	3,09 ± 0,1 _{aA}	3,06 ± 0,1 _{aA}	-
A ₀ (sem OEM)	3,22 ± 0,2 _{aA}	3,17 ± 0,2 _{aA}	3,15 ± 0,1 _{aA}	3,12 ± 0,1 _{aA}	-
A ₁ (0,06 % OEM)	3,21 ± 0,2 _{aA}	3,16 ± 0,2 _{aA}	3,15 ± 0,2 _{aA}	3,10 ± 0,1 _{aA}	3,05 ± 0,2 _A
Compostos Fenólicos Totais (mg/g FF)					
Controle	1,05 ± 0,0 _{aA}	1,02 ± 0,0 _{aA}	0,92 ± 0,0 _{aB}	-	-
UVC (sem cobertura)	1,04 ± 0,1 _{aA}	1,0 ± 0,1 _{aA}	0,95 ± 0,0 _{abA}	1,0 ± 0,1 _{aA}	-
A ₀ (sem OEM)	1,06 ± 0,1 _{aA}	1,0 ± 0,1 _{aA}	1,04 ± 0,1 _{bA}	0,97 ± 0,1 _{aA}	-
A ₁ (0,06 % OEM)	1,04 ± 0,1 _{aA}	0,97 ± 0,1 _{aA}	1,05 ± 0,0 _{bA}	1,01 ± 0,0 _{aA}	0,98 ± 0,1 _A

*Letras minúsculas iguais nas colunas e letras maiúsculas iguais na mesma linha para o mesmo parâmetro significam que as amostras não diferem significativamente com base no teste de Tukey ($p > 0,05$). (-) dados não registrados, qualidade do morango não apta para análise.

Antocianinas Totais

As concentrações de antocianinas totais nos morangos sem e com cobertura comestível estão apresentadas na Tabela 5.5. Os níveis de antocianinas nos morangos sem e com cobertura (variando de 0,04 a 0,03 mg/g fruta fresca) foram abaixo dos valores encontrados na literatura (DONG e WANG, 2017; KALIFA et al., 2016), e não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre si e nem diferença entre os dias de armazenamento à 6 °C. Gol et al. (2013) relataram que os morangos escurecem durante o armazenamento, pois ocorre a síntese de antocianinas da célula após a decomposição do fruto. Através da análise de cor, foi observado o escurecimento dos morangos dos diferentes tratamentos com relação a luminosidade, porém quanto ao parâmetro a^* (relativo a cor vermelha) os frutos com cobertura A₁ (0,06 % OEM) não apresentaram aumento da cor vermelha com os dias de armazenamento, indicando, através desses resultados, que após a colheita dos morangos não houve mais biossíntese de antocianinas para essas amostras.

Tabela 5.5 – Antocianinas totais de morangos sem e com cobertura à base de gelatina e OEM, armazenados à 6 °C e 95 % UR.

Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)			
	0	4	6	8
Antocianinas Totais (mg/g FF)				
Controle	0,04 ± 0,01 _{aa}	0,03 ± 0,01 _{aa}	-	-
UVC (sem cobertura)	0,04 ± 0,01 _{aa}	0,04 ± 0,01 _{aa}	0,03 ± 0,01 _{aa}	-
A ₀ (sem OEM)	0,04 ± 0,01 _{aa}	0,04 ± 0,00 _{aa}	0,04 ± 0,01 _{aa}	-
A ₁ (0,06 % OEM)	0,04 ± 0,01 _{aa}	0,04 ± 0,00 _{aa}	0,04 ± 0,00 _{aa}	0,04 ± 0,01 _{aa}

*Letras minúsculas iguais nas colunas e letras maiúsculas iguais na mesma linha para o mesmo parâmetro significam que as amostras não diferem significativamente com base no teste de Tukey ($p > 0,05$). (-) dados não registrados, qualidade do morango não apta para análise.

5.4 Conclusão

Concentrações acima de 0,25 % de óleo de menta nas formulações de coberturas comestíveis à base de gelatina provocaram a queima e amolecimento da superfícies dos morangos. Enquanto que, as coberturas com menores concentrações de OEM e NOEM foram eficazes na redução do desenvolvimento dos fungos (*B. cinerea* e *R. stolonifer*), na taxa de respiração e produção de etileno dos morangos inoculados e armazenados à 15 °C e 95 % UR. Como não houve diferença nos parâmetros físico-químicos e halo de inibição para os fungos estudados entre a incorporação do óleo na forma original ou como uma emulsão, utilizou-se a cobertura comestível contendo 0,06 % de OEM (A₁) para o armazenamento dos morangos à 6 °C e 95 % de UR. Nessas condições houve redução significativa do desenvolvimento fúngico, diminuiu a perda de água, diminuiu a taxa de respiração e manteve a cor e firmeza dos frutos. Além disso, mostrou melhores parâmetros de qualidade dos morangos, como pH, SST, açúcares, ácidos orgânicos, capacidade antioxidante e compostos fenólicos com o tempo de armazenamento.

5.5 Referências Bibliográficas

ABBASZADEH, S., SHARIFZADEH, A., SHOKRI, H., KHOSRAVI, A. R., ABBASZADEH, A. **Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi.** Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology, v. 24, p. 51–56, 2014.

ADAY, M. S., CANER, C. **The shelf life extension of fresh strawberries using an oxygen absorber in the biobased package.** LWT - Food Science and Technology, v. 52, p. 102–109, 2013.

ALEXANDRE, E. M. C., BRANDÃO, T. R. S., SILVA, C. L. M. **Efficacy of non-thermal technologies and sanitizer solutions on microbial load reduction and quality retention of strawberries.** Journal of Food Engineering, v. 108, p. 417–426, 2012.

ARAQUE, L. C. O.; RODONIA, L. M.; DARRÉA, M.; ORTIZA, C. M.; CIVELLO, P. M.; VICENTEA, A. R. **Cyclic low dose UV-C**

treatments retain strawberry fruit quality more effectively than conventional pre-storage single high fluence applications. *LWT - Food Science and Technology*. v. 92, p. 304–311, 2018.

BASSO, A.; MOREIRA, R. F. P. M.; JOSE, H. J. **Oxidação fotocatalítica de etileno: uma estratégia para a redução do descarte de frutas e hortaliças.** In: 6º Congresso internacional de tecnologia para o meio ambiente, 2018, v. 1. Bento Gonçalves, 2018.

BATISTA, F. O. **Estudo da influência das doses de uvc nas propriedades físico químicas, sensorial instrumental e microbiológica de morangos (*Fragaria x ananassa Duch.*).** 2017, p. 74. Dissertação de mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Faculdade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

BORGES, C. D., MENDONÇA, C. R. B., ZAMBIAZI, R. C., NOGUEIRA, D., PINTO, E. M., PAIVA, F. F. **Strawberries conservation with coatings based on xanthan gum and sage essential oil.** *Bioscience Journal*, v. 29, p. 1071-1083, 2013.

CALEB, O. J.; WEGNER, G.; ROLLECZEK, C.; HERPPICH, W. B.; GEYER, M.; MAHAJAN, P. V. **Hot water dipping: Impact on postharvest quality, individual sugars, and bioactive compounds during storage of ‘Sonata’ strawberry.** *Scientia Horticulturae*. v. 210, p. 150–157, 2016.

CÁRDENAS-PÉREZ, S., CHANONA-PÉREZ, J., MÉNDEZ-MÉNDEZ, J. V., CALDERÓN-DOMÍNGUEZ, G., LOPEZ-SANTIAGO, R., PEREA-FLORES, M. J., ARZATE-VAZQUEZ, I. **Evaluation of the ripening stages of apple (Golden Delicious) by means of computer vision system.** *Biosystems Engineering*, v. 159, p. 46 – 58, 2017.

CHIRALT, A., MARTINEZ-NAVARRETE, N., MARTINEZ-MONZO, J., TALENS, P., MORAGA, G., AYALA, A., FITO, P. **Changes in mechanical properties throughout osmotic processes: cryoprotectant effect.** *Journal of Food Engineering*, v. 49, p. 129-135, 2001.

COMBRINCK, S., REGNIER, T., KAMATOU, G. P. P. **In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit.** *Industrial Crops and Products*, v. 33, p. 344–349, 2011.

COTE, S.; RODONI, L.; MICELI, E.; CONCELLÓNA, A.; CIVELLO, P. M.; VICENTE, A. R. **Effect of radiation intensity on the outcome of postharvest UV-C treatments.** *Postharvest Biology and Technology*, v.83, p. 83–89, 2013.

DIAB, T.; BILIADERIS, C. G.; GERASOPOULOS, D.; SFAKIOTAKIS, E. **Physicochemical properties and application of pullulan edibles films and coatings in fruit preservation.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 81, n. 10, p. 988-1000, 2001.

DONG, F.; WANG, X. **Effects of carboxymethyl cellulose incorporated with garlic essentialoil composite coatings for improving quality of strawberries.** *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 104, p. 821–826, 2017.

DONSÌ, F., ANNUNZIATA, M., SESSA, M., FERRARI, G. **Nanoencapsulation ofessential oils to enhance their antimicrobial activity in foods.** *LWT: Food Sci.Technol*, v. 44, p. 1908–1914, 2011.

DONSÌ, F., MARCHESE, E., MARESCA, P., PATARO, G., VU, K.D., SALMIERI, S., LACROIX, M.,FERRARI, G. **Green beans preservation by combination of a modifiedchitosan based-coating containing nanoemulsion of mandarin essential oil with high pressure or pulsed light processing.** *Postharvest Biol. Technol*, v. 106, p. 21–32, 2015.

DONSÌ, F., FERRARI G. **Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food.** *Journal of Biotechnology*, v. 233, p. 106–120, 2016.

DURAN, M.; ADAY, M. S.; ZORBA, N. N. D.; TEMIZKANA, R.; BÜYÜKCANB, M. B.; CANER, C. **Potential of antimicrobial active packaging‘containing natamycin, nisin, pomegranate andgrape seed extract in chitosan coating’ to extendshelf life of fresh strawberry.** *Food and bioproducts processing*. v. 98. p. 354–363, 2016.

EL-MOGY, M. M, ALSANIUS, B. W. **Cassia oil for controlling plant and human pathogens on fresh strawberries.** Food Control, v. 28, p. 157–162, 2012.

FAGUNDES, C., PÉREZ-GAGO, M. B., MONTEIRO, A. R., PALOU, L. **Antifungal activity of food additives in vitro and as ingredients of hydroxypropyl methylcellulose-lipid edible coatings against *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit.** International Journal of Food Microbiology, v. 166, p. 391-398, 2013.

FAMIANI, F., CULTRERA, N.G., BATTISTELLI, A., CASULLI, V., PROIETTI, P., STANDARDI, A., CHEN, Z.H., LEEGOOD, R.C., WALKER, R.P. **Phosphoenolpyruvate carboxykinase and its potential role in the catapolum of organic acids in the flesh of soft fruit during ripening.** Journal of Experimental Botany, v. 56, p. 2959 – 2969, 2005.

GOL, N. B.; PATEL, P. R.; RAO, T. V. R. **Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan.** Postharvest Biology and Technology. v. 85, p. 185–195, 2013.

GUERRA, I. C. D., OLIVEIRA, P. D. DE, PONTES, A. L. S., LÚCIO, A. S. S. C., TAVARES, J. F., BARBOSA-FILHO, J. M., MADRUGA, M. S., E. L. DE. **Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha × villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit.** International Journal of Food Microbiology, v. 214, p. 168–178, 2015.

GUERREIRO, A. C., GAGO, C. M. L., FALEIRO, M. L., MIGUEL, M. G. C., ANTUNES, M. D. C. **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, 2015.

GÜNDÜZ, K.; ÖZDEMİR, E. **The effects of genotype and growing conditions on antioxidant capacity, phenolic compounds, organic acid and individual sugars of strawberry.** Food Chemistry. v. 155, p. 298–303, 2014.

HAJJI, S.; YOUNES, I.; AFFES, S.; BOUFI, S.; NASRI, M. **Optimization of the formulation of chitosan edible coatings supplemented with carotenoproteins and their use for extending strawberries postharvest life.** Food Hydrocolloids. v. 83, p. 375-392, 2018.

KHALIFA, I.; BARAKAT, H.; EL-MANSY, H. A.; SOLIMAN, S. A. **Enhancing the keeping quality of fresh strawberry using chitosan-incorporated olive processing wastes.** Food Bioscience. v. 13, p. 69–75, 2016.

KONICA MINOLTA. **Precise Color Communication: Color control from perception to instrumentation.** Konica Minolta Sensing, Inc. 3-91, Daisennishimachi, Sakai. Osaka 590-8551, Japan, 1998.

LI, D.; LUO, Z.; MOU, W.; WANG, Y.; YING, T.; MAO, L. **ABA and UV-C effects on quality, antioxidant capacity and anthocyanin contents of strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.).** Postharvest Biology and Technology, v. 90, p. 56–62, 2014.

NILSUWAN, K.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. **Quality changes of shrimp cracker covered with fish gelatin film without and with palm oil incorporated during storage.** International Aquatic Research. v. 8, p. 227–238, 2016.

OTONI, C. G., MOURA, M. R., AOUADA, F. A., CAMILLOTO, G. P., CRUZ, R. S., LOREVICE, M. V., SOARES, N. F. F., MATTOSO, L. H. C. **Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films.** Food Hydrocolloids, v. 41, p. 188 - 194, 2014.

OREGEL-ZAMUDIO, E., ANGOA-PÉREZ, M. V., OYOQUE-SALCEDO, G., AGUILAR-GONZÁLEZ, C. N., MENA-VIOLANTE, H. G. **Effect of candelilla wax edible coatings combined with biocontrol bacteria on strawberry quality during the shelf-life.** Scientia Horticulturae, v. 214, p. 273–279, 2017.

PERETTO, G.; DUB, W.X.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; SARREALB, S. B. L.; HUAB, S. S. T.; SAMBOA, P.; MCHUGH, T. H. **Increasing strawberry shelf-life with carvacrol and methyl cinnamate antimicrobial vapors released from edible films.** *Postharvest Biology and Technology*. v. 89, p. 11–18, 2014.

PERDONES, A.; SANCHEZ-GONZALEZ, L.; CHIRALT, A.; VARGAS, M. **Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of Strawberry.** *Postharvest Biology and Technology*. v. 70, p. 32–41, 2012.

PERDONES, A., ESCRICHE, I, CHIRALT, A., VARGAS, M. **Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on volatile profile of strawberries during storage.** *Food Chemistry*, v. 197, p. 979–986, 2016.

PERSICO, P., AMBROGI, V., CARFAGNA, C., CERRUTI, P., FERROCINO, I., MAURIELLO, G. **Nanocomposite polymer films containing carvacrol for antimicrobial active packaging.** *Polymer Engineering & Science*, v. 49, p. 1447 – 1455, 2009.

PIRES, C.; RAMOS, C.; TEIXEIRA, G.; BATISTA, R.; NUNES, L.; MARQUES, A. **Characterization of biodegradable films prepared with hake proteins and thyme oil.** *Journal of Food Engineering*. J., v. 105, p. 422 – 428, 2011.

RASO, J., BARBOSA-CÂNOVAS, V. **Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 43, p. 265–285, 2003.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; JIMENES-PEREZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. **Metodologia Científica: determinação da atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical ABTS.** *Comun. Técnico Embrapa Agroindústria. Trop.* v. 127, p. 1-4, 2007a.

RUFINO, M.S.M., ALVES, R.E., BRITO, E.S., MORAIS, S.M., SAMPAIO, C.G., JIMENES-PEREZ, J., SAURA-CALIXTO, F.D. **Metodologia Científica: determinação da Atividade Antioxidante**

Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Comun. T_ecnico Embrapa Agroind. Trop. v. 128, p. 1-4, 2007b.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; PASTOR, C.; VARGAS, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHÁFER, M. **Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes.** Postharvest Biology and Technology, v.60, p.59, 2011.

SANGSUWAN, J.; PONGSAPAKWORAWAT, T.; BANGMO, P.; SUTTHASUPA, S. **Effect of chitosan beads incorporated with lavender or red thyme essential oils in inhibiting Botrytis cinerea and their application in strawberry packaging system.** LWT - Food Science and Technology. v. 74, p. 14-20, 2016.

SEVERINO, R., VU, K.D., DONSI, F., SALMIERI, S., FERRARI, G., LACROIX, M. **Antibacterial and physical effects of modified chitosan based-coating containing nanoemulsion of mandarin essential oil and three non-thermal treatments against Listeria innocua in green beans.** International Journal of Food Microbiology, 191, 82–88, 2014a.

SEVERINO, R., VU, K.D., DONSI, F., SALMIERI, S., FERRARI, G., LACROIX, M. **Antimicrobial effects of different combined non-thermal treatments against Listeria monocytogenes in broccoli florets.** Journal of Food Engineering, v. 124, p. 1–10, 2014b.

SEVERINO, R., FERRARI, G., VU, K.D., DONSI, F., SALMIERI, S., LACROIX, M. **Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium on green beans.** Food Control, v. 50, p. 215–222, 2015.

SINGLETON, V. L., ROSSI, J. A. **Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdc-Phosphotungstic Acid Reagents.** American Journal of Enology and Viticulture, v. 16, p. 144-158, 1965.

SHAHBAZI, Y. **Application of carboxymethyl cellulose and chitosan coatings containing Mentha spicata essential oil in fresh strawberries.**

International Journal of Biological Macromolecules. v. 112, p. 264–272, 2018.

SHIN, Y., SONG, H., SONG, K. B. **Effect of a combined treatment of rice bran protein film packaging with aqueous chlorine dioxide washing and ultraviolet-C irradiation on the postharvest quality of ‘Goha’ strawberries.** *Journal of Food Engineering*, v. 113, p. 374–379, 2012.

TIWARI, P. **Recent advances and challenges in trichome research and essential oil biosynthesis in *Mentha arvensis* L.** *Industrial Crops and Products*, v. 82, p. 141–148, 2016.

TOIVONEN, P. M. A.; BRUMMELL, D. A. **Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables.** *Postharvest Biology and Technology*. v. 48, p. 1–14, 2008.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODIPRAN, T. **Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils.** *Food Chemistry*, v. 134, p.1571–1579, 2012.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODIPRAN, T. **Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils.** *Journal of Food Engineering*. J., v. 117, p. 350 – 360, 2013.

TORRIERI, E.; CAVELLA, S.; MASI, P. **Modelling the respiration rate of fresh-cut Annurca apples to develop modified atmosphere packaging.** *International Journal of Food Science and Technology*. v. 44, p. 890–899, 2009.

URBAN, L., CHARLES, F., MIRANDA, M. R. A., AARROUF, J. **Understanding the physiological effects of UV-C light and exploiting its agronomic potential before and after harvest.** *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 105, p. 1 – 11, 2016.

WANG, S.; GAO, H. **Effect of chitosan-based edible coating on antioxidants, antioxidant enzyme system, and postharvest fruit**

quality of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). LWT - Food Science and Technology. v. 52, p. 71-79, 2013.

VALENZUELA, C.; TAPIA, C.; LÓPEZ, L.; BUNGER, A.; ESCALONA, V.; ABUGOCH, L. **Effect of edible quinoa protein-chitosan based films on refrigerated strawberry (*Fragaria × ananassa*) quality.** Electronic Journal of Biotechnology. v. 18, p. 406–411, 2015.

VELICKOVA, E., WINKELHAUSEN, E., KUZMANOVA, S., ALVES, V. D., MOLDÃO-MARTINS, M. **Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa cv Camarosa*) under commercial storage conditions.** LWT - Food Science and Technology. v. 52, p. 80-92, 2013.

VENTURA-AGUILAR, R.I.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; FLORES-GARCÍA, G.; ZAVALETA-AVEJAR, L. **Impact of chitosan based edible coatings functionalized with natural compounds on *olletotrichum fragariae* development and the quality of strawberries.** Food Chemistry. v. 262, p. 142–149, 2018.

VU, K. D., HOLLINGSWORTH, R.G., LEROUX, E., SALMIERI, S., LACROIX, M.

Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. Food Research International, v. 44, p. 198–203, 2011.

XIE, Z.; FAN, J.; CHARLES, M. T.; CHARLEBOIS, D.; KHANIZADEH, S.; ROLLAND, D.; ROUSSEL, D.; ZHANG, Z. **Preharvest ultraviolet-C irradiation: Influence on physicochemical parameters associated with strawberry fruit quality.** Plant Physiology and Biochemistry, v. 108, p. 337-343, 2016.

ZHU, S.; ZHOU, J. **Effect of nitric oxide on ethylene production in strawberry fruit during storage.** Food Chemistry. v.100, p. 1517–1522, 2007.

CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES FINAIS GERAL

- As diferentes concentrações de OEM incorporadas nas soluções de coberturas comestíveis à base de gelatina usando agitação com ultraturrax melhoraram as propriedades dos filmes até a concentração de 0,25 % de óleo, quanto à barreira ao vapor de água, propriedades mecânicas e distribuição do óleo na matriz de gelatina. E a capacidade antifúngica contra o desenvolvimento de *B. cinerea* e *R. stolonifer* foi observada apenas para a formulação (A₅ 0,50 %) de maior concentração de óleo de menta no filme.
- A técnica de nanoemulsão de óleo essencial de menta por sonicação mostrou-se eficaz na redução do tamanho de partícula e estabilidade da nanoemulsão com 50 % de óleo.
- O óleo na forma de nanoemulsão (NOEM) incorporada em diferentes concentrações nas soluções de coberturas comestíveis de gelatina melhorou a distribuição das gotículas de óleo em toda a matriz de gelatina dos filmes para todas as formulações filmogênicas, proporcionando filmes menos permeáveis ao vapor de água, mais homogêneos, mais elásticos e menos rígidos.
- A incorporação de NOEM na cobertura comestível aumentou a capacidade antifúngica dos filmes a partir da concentração de 0,25 % de óleo nas formulações, indicando a potencialidade dessa técnica para inibição do crescimento dos fungos estudados.
- A atividade antifúngica e qualidade físico-química de morangos inoculados com *B. cinerea* e *R. stolonifer*, após aplicação das diferentes coberturas comestíveis adicionadas de OEM e NOEM, mostrou que as formulações com concentrações acima de 0,25 % de óleo de menta afetaram negativamente a superfície dos frutos, causando a queima da pele e amolecimento dos morangos.

- A aplicação de coberturas comestíveis de gelatina com 0,06 % de OEM e NOEM em morangos inoculados com *B. cinerea* e *R. stolonifer* apresentou melhores resultados quanto à firmeza dos frutos, redução no desenvolvimento fúngico, na taxa de respiração e produção de etileno com relação aos frutos controle.
- A higienização de morangos com luz UV-C promoveu a redução do desenvolvimento fúngico nos frutos com relação ao controle, e pode ter aumentado a capacidade antifúngica do óleo essencial de menta adicionado na cobertura comestível de gelatina (A₁ 0,06 % OEM) aplicada como revestimento nos morangos.
- O uso de cobertura comestível à base de gelatina com OEM como agente antifúngico é um método não poluente e eficaz para reduzir as perdas pós-colheita de morangos, causadas principalmente por fungos, desidratação e danos mecânicos. Essa técnica diminuiu a senescência dos morangos e aumentou o tempo de armazenamento por 8 dias a temperatura de 6 °C e 95 % de UR.
- Estudos usando outras técnicas de controle fitopatogênicos combinadas com aplicação de coberturas comestíveis com agentes antimicrobianos naturais são alternativas para aumentar o tempo de vida útil de morango.