

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Faculdade de Nutrição  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



**Dissertação**

**Desenvolvimento de cobertura bioativa de gelatina para morangos adicionada de óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e de laranja doce (*Citrus aurantium* var. *Dulcis*) com propriedades antimicrobianas e estudo das percepções de consumo por associação implícita**

Giovane Miranda Sodré

Pelotas, maio de 2021

GIOVANE MIRANDA SODRÉ

**Desenvolvimento de cobertura bioativa de gelatina para morangos adicionada de óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris L.*) e de laranja doce (*Citrus aurantium* var. *Dulcis*) com propriedades antimicrobianas e estudo das percepções de consumo por associação implícita**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientador – Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra

Co-orientadores – Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Arocha Gularde

– Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiane Kuka Valente Gandra

Pelotas, maio de 2021

## **Agradecimentos**

A realização do trabalho necessitou de contribuições que foram fundamentais para a construção e desenvolvimento. Iniciando os agradecimentos pelo Professor Doutor Eliezer Avila Gandra, quem disponibilizou-se em tempo integral guiando e instigando os percursos da pesquisa, para além deste, a Professora e Doutora Marcia Arocha Gularte bem como a Professora e Doutora Tatiane Kuka Valente Gandra, que auxiliaram dedicando tempo e conhecimento na busca de resoluções para os problemas advindos, e nas revisões prestadas.

Tudo se concretizou posteriormente a oportunidade de desenvolver um estudo ofertado pela Universidade Federal de Pelotas, da qual contribuiu não só para a entrada no programa de mestrado, tal como, com os equipamentos, espaços, e aulas para que fosse possível concluir a pesquisa.

Em busca dos resultados, a mestrandona Gabriela Venturini teve participação essencial nas diferentes etapas laboratoriais, compartilhamento de conhecimentos e auxílio nas questões metodológicas.

## Resumo

SODRÉ, Giovane Miranda. **Desenvolvimento de cobertura bioativa de gelatina para morangos adicionada de óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e de laranja doce (*Citrus aurantium* var. *Dulcis*) com propriedades antimicrobianas e estudo das percepções de consumo por associação implícita.** 2021. 81 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

### Resumo

O morango tem uma participação importante na agroindústria brasileira, porém, apresenta alta perecibilidade. A grande demanda do mercado consumidor por produtos considerados “mais saudáveis”, faz crescer o interesse por métodos de conservação utilizando compostos bioativos, estruturas naturais e menos agressivos ao meio ambiente. Neste contexto estudos utilizando coberturas comestíveis, quando combinados ao armazenamento em baixas temperaturas em morangos, tem demonstrado eficácia na inibição de microrganismos como fungos. Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário de plantas e em função de suas características bioativas, dentre elas, a ação antimicrobiana, tem potencial para serem utilizadas na indústria alimentícia. *Salmonella* spp. é uma bactéria patogênica que pode causar doença de origem alimentar (DTA), sendo uma dos micro-organismos mais associados a surtos de DTA em diversos países. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver coberturas comestíveis bioativas a base de gelatina, adicionadas de óleo essencial de tomilho e de laranja doce, aplicar estas por imersão em morangos avaliando características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais determinantes da vida útil de morangos até 15 dias. Quanto às análises microbiológicas foram quantificadas bactérias aeróbias mesófilas, bactérias psicrotróficas, fungos, coliformes totais e termotolerantes com especial atenção ao efeito anti-*Salmonella* spp. Os resultados basearam-se em verificar a presença ou ausência nas amostras contaminadas nos diferentes tempos. Em relação a *Salmonella* spp verificou-se que as coberturas com óleo essencial de laranja, sozinho ou em conjunto com o de tomilho, apresentaram efeito inibitório deste microrganismo, podendo associar esta ação a presença do óleo de laranja doce. Para o teste sensorial foi aplicado o Teste de Associação Implícita (TAI), para identificar as percepções em ações e conceitos, medindo a força associativa, quando exposto a imagens e palavras.

**Palavras-chave:** *Salmonella* spp; Tecnologia; Frutas

## Abstract

SODRÉ, Giovane Miranda. **Development of a bioactive gelatin cover for strawberries with essential oils of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and sweet orange (*Citrus aurantium* var. *Dulcis*) with antimicrobial properties.** 2021. 81 f. Dissertation (Master in Nutrition and Food) - Graduate Program in Nutrition and Food, Faculty of Nutrition, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2019.

## Abstract

Strawberries play an important role in the Brazilian agribusiness; however, they are highly perishable. The great demand of the consumer market for products considered "healthier", increases the interest in conservation methods using bioactive compounds, natural structures and less aggressive to the environment. In this context, studies using edible toppings, when combined with storage at low temperatures in strawberries, have demonstrated efficacy in inhibiting microorganisms such as fungi. Essential oils are products of the secondary metabolism of plants and due to their bioactive characteristics, among them, the antimicrobial action, has the potential to be used in the food industry. *Salmonella* app. is a pathogenic bacterium that can cause foodborne disease (DTA), being one of the microorganisms most associated with DTA outbreaks in several countries. The objective of the present work was to develop edible bioactive toppings based on gelatin, added with essential oil of thyme and sweet orange, to apply these by immersion in strawberries, evaluating the physicochemical, microbiological and sensory characteristics that determine the shelf life of strawberries up to 15 days. As for microbiological analyzes, mesophilic aerobic bacteria, psychrotrophic bacteria, fungi, total and thermotolerant coliforms were quantified with special attention to the anti-*Salmonella* spp. The results were based on verifying the presence or absence of the contaminated samples at different times. In relation to *Salmonella* spp, it was found that the coverings with orange essential oil, alone or in conjunction with that of thyme, showed an inhibitory effect of this microorganism, which may associate this action with the presence of sweet orange oil. For the sensory test, the Implicit Association Test (IAT) was applied to identify perceptions in actions and concepts, measuring associative strength, when exposed to images and words.

**Keywords:** Toppings; Technology; Fruits

## **LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1- Análises físico-químicas .....
- Tabela 2- Coliforme termotolerantes .....
- Tabela 3- Microrganismos Mesófilos aeróbios .....
- Tabela 4- Fungos .....
- Tabela 5- Microrganismos Psicrotróficos aeróbios .....
- Tabela 6- *Salmonella* spp .....

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>11</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Hipóteses</b>	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>Revisão de Literatura</b>	<b>13</b>
<b>4.1</b>	<b>Morango</b>	<b>13</b>
<b>4.2</b>	<b>Coberturas</b>	<b>13</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Gelatina</b>	<b>14</b>
<b>4.3</b>	<b>Óleos essenciais</b>	<b>15</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Óleo essencial de Tomilho</b>	<b>16</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Óleo essencial de laranja doce</b>	<b>16</b>
<b>4.5</b>	<b>Salmonella spp</b>	<b>17</b>
<b>5</b>	<b>Projeto de Pesquisa</b>	<b>19</b>
<b>6</b>	<b>Resultados e impactos esperados</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>Cronograma de atividades</b>	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>Orçamento</b>	<b>44</b>
	<b>Referências</b>	<b>45</b>
<b>9</b>	<b>Relatório de Campo</b>	<b>50</b>
<b>10</b>	<b>Artigo</b>	<b>51</b>
<b>11</b>	<b>Considerações finais</b>	<b>76</b>
	<b>Referências bibliográficas</b>	<b>77</b>

## 1 Introdução

O morango tem uma participação importante na agroindústria brasileira, podendo ser consumido tanto *in natura* quanto processado. Originário de regiões de clima temperado, pode ser cultivado em grande parte do território brasileiro, alcançando uma produção significativa (EMBRAPA, 2011).

A grande demanda do mercado por produtos considerados “mais saudáveis”, faz crescer o interesse por métodos de conservação mais sustentáveis, com menor utilização de conservantes químicos sintéticos, que aumentem a durabilidade e a vida de prateleiras dos alimentos, tornado uma alternativa viável as coberturas comestíveis bioativas para atender a crescente demandado mercado cada vez mais exigente (MAFTOONAZAD, RAMASWAMY, *et al.*, 2007).

Estudos utilizando coberturas comestíveis, quando combinados ao armazenamento em baixa temperatura em morangos, tem demonstrado eficácia na inibição de fungos, além de manter características importantes dos frutos aumentando assim, a sua aceitação ao consumidor (DE OLIVEIRA, SILVA, *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais em função de suas características bioativas, dentre elas, o potencial antimicrobiano, podem ser utilizados na indústria alimentícia, por fazerem parte da dieta humana há muitos anos são considerados seguros, possuindo potencial para se tornarem uma alternativa sustentável aos conservantes químicos sintéticos (PERSICO, AMBROGI, *et al.*, 2009).

A utilização de óleo essencial de tomilho vem mostrando um dos melhores resultados antimicrobianos entre os óleos essenciais (WATTANASATCHA, RENGPIPAT, *et al.*, 2012). Já os óleos essenciais cítricos, que são obtidos como subprodutos da indústria, devido ao seu aroma muito agradável, também vem sendo testados como alternativa antimicrobiana (MARTINS, ZAGO, *et al.*, 2017).

*Salmonella* spp. é uma bactéria patogênica descoberta pela primeira vez pelo cientista americano Dr. Daniel E. Salmon em 1885, que pode causar doença de origem alimentar, como a salmonelose sua morbidade e mortalidade tem alcançado números elevados em diversos países, a estimativa do Centro de

Controle e Prevenção (CDC) que a salmonella causa cerca de 1,35 milhoes de doenças, com 420 mortes por ano nos EUA (CDC, 2019).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo desenvolver coberturas comestíveis bioativas em morangos, a base de gelatina, adicionadas de óleo essencial de tomilho e de laranja doce, com propriedades antimicrobianas especialmente contra *Salmonella* spp. e estudar as percepções de consumo por associação implícita.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e aplicar coberturas comestíveis bioativas a base de gelatina, adicionadas de óleo essencial de tomilho e/ou de laranja doce com propriedades antimicrobianas em morangos, especialmente contra *Salmonella* spp. e estudar as percepções de consumo por associação implícita

### 2.2 Objetivos específicos

Desenvolver coberturas bioativas a base de gelatina adicionadas de óleos essenciais de tomilho e/ou de laranja doce;

Avaliar as características físico-químicas de morangos com cobertura bioativa de gelatina adicionada de óleo essencial de tomilho e/ou de laranja doce;

Avaliar as propriedades antimicrobianas frente a bactérias psicrotróficas, mesófilas, coliformes termotolerantes e fungos de morangos com cobertura bioativa de gelatina adicionada de óleo essencial de tomilho e/ou de laranja doce;

Aplicar a cobertura bioativa de gelatina adicionada de óleo essencial de tomilho e/ou de laranja doce em morangos e avaliar a atividade antibacteriana *in situ* frente a *Salmonella* spp.

Verificar as percepções associativas de morangos com cobertura bioativa de gelatina adicionada de óleo essencial de tomilho e/ou de laranja doce através de estudo de neurosensorial através do teste TAI.

## 3 Hipóteses

Coberturas bioativas de gelatina incorporadas com óleos essenciais de tomilho e de laranja doce, mantêm as características físico-químicas e inibem o desenvolvimento de bactérias psicrotróficas, mesófilas, coliformes termotolerantes e fungos em morangos refrigerados.

Morangos com coberturas bioativas de gelatina incorporadas com óleo essencial de tomilho e/ou de laranja doce, apresentam efeito antimicrobiano frente a *Salmonella* spp.

Morangos com coberturas bioativas de gelatina incorporadas com óleo essencial de tomilho e/ou de laranja doce, apresentam percepções associativas para o consumo.

## 4 Revisão de Literatura

### 4.1 Morango

O morango pertence à família Rosaceae do gênero *Fragaria* sendo a espécie *Fragaria x ananassa* Duch originária da América do Norte e Chile, apresenta diversas características sensoriais que atraem os consumidores, como a cor, aroma e sabor. Apresenta ainda quantidades significativas de vitamina C a qual tem papel fundamental no metabolismo humano, como preservação de ossos, dentes, gengivas entre outras funções. Além disso, tornou-se uma importante opção para a cadeia produtiva, atraindo um número significativo de produtores, gerando uma demanda crescente de empregos e renda no campo. No Brasil não há informações oficiais sobre a introdução desse fruto, mas sugerem que foi por volta de 1950 no sul do estado de Minas Gerais (EMBRAPA, 2016).

Em relação à produção de morango, ainda há uma carência de informações estatísticas, porém, segundo a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais (EMATER-MG), a produção do país em 2010 foi de 133,391 toneladas em uma área de 3,718 há (EMBRAPA, 2016). E Através dos dados obtidos pela FAO (2017), a América do Sul vem produzindo cerca de 167.334 toneladas de morangos em 7.725 hectares, sendo Venezuela, Colômbia, Peru e Argentina os responsáveis pela maior área de produção.

O morango é um fruto que apresenta uma estrutura frágil e com alta taxa de atividade respiratória, resultando em uma conservação pós-colheita relativamente curta, apresentando uma grande dificuldade de fornecer esse alimento na forma *in natura*. Por esse motivo buscam-se alternativas para aumentar o prazo de vida útil do morango (EMBRAPA, 2016).

### 4.2 Coberturas

A utilização de coberturas e revestimentos comestíveis são definidos como filmes, dos quais são pré-formados em um suporte e depois são aplicados sobre o produto, como coberturas, cobrindo a superfície do alimento. Os métodos podem ser por imersão, aspersão, fluidização ou aplicação com um

pincel, ainda se encontra em processo de desenvolvimento para fins comerciais, porém, vários estudos vêm mostrando bons resultados nas últimas décadas, apresentando potencial na conservação de alimentos nos quais o tempo de prateleira é reduzido (ASSIS, BRITTO, 2014).

Costa (2009) ao utilizar coberturas de quitosana em morangos verificou benefícios em relação a qualidade durante o armazenamento a 0 °C e a 25 °C . Além disso, a adição de cloreto de cálcio ou ácido ascórbico proporcionou um ganho no controle de desenvolvimento fúngico e na manutenção da firmeza. Esse estudo demonstrou que o ácido ascórbico apresentou bons resultados relacionados a conservação e aceitabilidade, prolongando a vida útil do fruto sob refrigeração por até 12 dias e quando conservado em temperatura ambiente teve a vida útil prolongada em até 3 dias.

Alvez et al (2011) estudando revestimentos em morangos a base de biofilmes de amido, foi possível observar uma diminuição na perda de massa do fruto. Os morangos com revestimento a base de amido de milho foram os que apresentaram a menor perda de massa no período de armazenamento. As amostras sem o revestimento apresentaram uma deterioração visível na estrutura da superfície dos frutos, ao contrário da amostra que passou pelo tratamento composto por biofilmes de mandioca e amido modificado, onde foi inexistente a deterioração do fruto (ALVES, SARAIVA, et al., 2011).

Segundo Oliveira (2017), em seu estudo com coberturas a base de quitosana combinados com óleos essenciais de *Salvia sclarea* em morangos, foi possível obter resultados satisfatórios em relação a qualidade dos frutos armazenados refrigerados, mantendo boas características sensoriais e nutricionais, demonstrando ser uma alternativa viável em relação a custos. Mostrou-se ainda eficaz na conservação da massa, da vitamina C, da coloração e inibiu o surgimento de microrganismos indesejáveis (MARTINS, ZAGO, et al., 2017).

#### **4.2.1 Gelatina**

A gelatina é um produto resultante da hidrólise ácida ou básica de colágeno, oriunda de partes animais, como ossos e peles. Trata-se de um composto de longas cadeias de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, por

ser facilmente solúvel em água e produzida em grande escala por um baixo custo, é muito utilizada pelas indústrias farmacêuticas e alimentícias, favorecendo-se de suas diversas propriedades (CARVALHO, 2002). Apresenta entre os seus aminoácidos 33% de glicina, 20% de prolina e hidroxiprolina além de 11% de alanina (ROGERS, 2001)

Filmes a base de gelatina são os mais recomendados quando comparados com filmes convencionais como os de amido de milho, pois proporcionam aparência mais atrativa, brilhante e transparente, assim dando destaque e valorizando o fruto. A base de gelatina apresenta maior tensão de ruptura, portanto uma melhor proteção ao alimento (ALVES, SARAIVA, *et al.*, 2011).

No estudo de Ricardo (2015) com filmes biodegradáveis de recobrimento aplicados em morangos, empregou-se diferentes soluções para recobrimento, buscando a conservação de massa dos frutos. Os autores verificaram o melhor resultado no composto de gelatina e glicerol dissolvidos em água destilada, os quais destacam-se por serem coberturas comestíveis biodegradáveis promovendo barreira contra gases, além de barreiras mecânicas, prolongando a vida pós-colheita dos morangos (RICARDO, MORAIS, *et al.*, 2015).

D'Avila (2010) estudando biofilmes à base de gelatina, aplicado na conservação de frutos de mirtilo, encontrou resultados significativos. O biofilme de gelatina atuou como uma barreira na perda de água dos frutos, trazendo assim uma contenção da perda de massa em comparação ao grupo controle.

#### **4.3 Óleos essenciais**

Óleos essenciais são definidos como substâncias oleosas aromáticas de sabores ácidos e picantes, muitas vezes incolores ou até mesmo amareladas, podendo ser extraídos a partir de folhas, flores, sementes, galhos e raízes de plantas, podem ser utilizados como agentes antimicrobianos, antifúngicos e antiparasitários. Devido a isso possuem uma grande participação na produção de fármacos para o tratamento de doenças infecciosas. É um produto natural, de menor custo e baixo risco de toxicidade, que gera menos reações adversas para os demais organismo. Além disso, apresentam uma quantidade significativa de compostos que atuam no combate de agentes infecciosos, comprovados

cientificamente, como os compostos fenólicos e alguns óleos que apresentam mais de 60 compostos em suas propriedades (SARTO, ZANUSSO JUNIOR, 2014).

Os óleos essenciais tem potencial para serem utilizados em alimentos e reduzirem os riscos de contaminação por sua ação bactericida, podendo ainda diminuir a utilização de aditivos químicos sintéticos, sendo uma alternativa para atuar na produção de alimentos com menos riscos à saúde humana. Os óleos essenciais podem também contribuir com interessantes atributos sensoriais deixando os alimentos com agradável palatabilidade por sua interação com os substratos (MONTES, NETA, *et al.*, 2013).

Silva *et al.* (2013) estudou óleo essencial de orégano frente a *Salmonella Enteritidis*, encontrou resultados positivos na inibição deste patógeno, independe da origem e da época do ano de cultivo do orégano.

#### **4.3.1 Óleo essencial de Tomilho**

O tomilho (*Thymus vulgaris*) é encontrado em regiões secas e áridas, apresenta arbustos de pequeno porte com caules compactos e poucos ramos (CASTRO, CHEMALE, 1995).

Os óleos essenciais de tomilho têm potencial para serem utilizados como aditivos naturais devido as suas atividades antibacterianas e sua disponibilidade na natureza, ganhando espaço na aplicação da indústria de alimentos com o objetivo de controlar e aumentar a vida de prateleiras dos alimentos (CRISTINA BENINCÁ, 2018).

Silva e Rangel (2010), ao realizar uma análise fotoquímica do extrato das folhas de tomilho, identificaram a presença de fenóis, flavonoides, terpenos, taninos e cumarinas, verificaram ainda um potente efeito antimicrobiano, principalmente contra *Staphylococcus aureus* o qual é uma bactéria Gram-positiva que pode apresentar multirresistência a antibióticos.

#### **4.3.2 Óleo essencial de laranja doce**

O Gênero *Citrus* da Família *Rutaceae* apresenta uma grande variedade de plantas, como as laranjas, tangerinas e limões. Sendo originárias de regiões subtropicais do sul da Ásia, apresentam árvores de porte médio em formato arredondado com folhas e flores aromáticas. Os seus frutos apresentam um alto teor de vitamina C, vitamina A e também as vitaminas do complexo B, além de sais minerais, cálcio, potássio, sódio, fósforo e ferro (INSTITUTO DE AGRONÔMIA DE CAMPINAS, 2005).

Os óleos essenciais do Gênero *Citrus* são extraídos do pericarpo do fruto, obtidos de um subproduto da indústria de sucos. Há uma grande utilização dos derivados de óleos essenciais de laranja na fabricação de diversos produtos, partindo de sabonetes a produtos farmacêuticos (BIZZO, ANA MARIA, et al., 2009).

#### **4.5 *Salmonella* spp.**

*Salmonella* é uma bactéria patogênica de um gênero da Família *Enterobacteriaceae*, Gram-negativas, anaeróbias facultativas, com formatos de bastonetes. Multiplica-se em um ambiente favorável a partir de 5 °C, com temperatura ótima de crescimento em torno de 38 °C, por serem termossensíveis podem ser destruídas a partir de 60 °C entre 15 a 20 min. Ela pode causar dois tipos de doença, dependendo do sorotipo: salmonelose não tifoide e febre tifoide, já a salmonelose não tifoide podem ser bastante desagradáveis, mas a doença geralmente é autolimitada entre pessoas saudáveis, embora possa levar à morte em alguns casos. No Brasil, entre os anos de 2009 a 2018 foram notificados 2.431 surtos de DTAs, estando a *Salmonella* spp. em segundo lugar com 11,3% em relação aos agentes etiológicos envolvidos (BRASIL 2019) Estima que 1,35 milhões de doenças e 420 mortes por ano nos EUA (CDC, 2019).

Estão presente principalmente em produtos de origem animal, mas podem facilmente multiplicar-se na superfície de brotos de alfafa, de tomates, de cacau e de frutas. Podendo sobreviver ao trânsito gástrico quando associada a alimentos nos quais alguns fatores como baixa atividade de água e alto teor de gordura conferem proteção durante o trânsito pelo estômago (FORSYTHE, 2012).

Huang et al. (2012) estudaram a sobrevivência de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp em morangos congelados a -18 °C durante 12 semanas. Os resultados mostraram que ambos os patógenos persistiram por 4 semanas nos frutos. Um estudo utilizando óleo essencial de Sálvia esclareia na atividade das bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella* *Thyphimurium*, obtiveram resultados na redução e inativação das bactérias, assim comprovando a sua ação antibacteriana e antifúngica (BORGES, MENDONÇA, et al., 2013, UGALDE, 2014).

## 5 Projeto de Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos

### Dissertação



**Desenvolvimento de coberturas bioativas comestíveis para morangos com óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e de laranja doce (*Citrus aurantium* var. *Dulcis*) com propriedades anti-*Salmonella* spp**

**Giovane Miranda Sodré**

**Pelotas, 2019**

**Giovane Miranda Sodré**

**Desenvolvimento de coberturas bioativas comestíveis para morangos com óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e de laranja doce (*Citrus aurantium* var. *Dulcis*) com propriedades anti-*Salmonella* spp**

Projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra

Co-Orientador (es): Profa. Dra. Marcia Arocha Gularte

Profa. Dra. Tatiane Kuka Valente Gandra

Pelotas, 2019

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra – Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos – UFPel (Orientador)

Prof<sup>a</sup>. Dra. Simone Pieniz - Faculdade de Nutrição – UFPel (Titular)

Prof<sup>a</sup>. Dra. Jozi Fagundes de Mello – Faculdade de Nutrição – UFPel (Suplente)

## Resumo

O morango trata-se de um híbrido natural, resultante de um cruzamento casual entre duas espécies. O mercado consumidor tem uma grande aceitação por suas características atraentes como coloração, aroma e sabor, além de apresentar uma quantidade significativa de flavonoides com alta atividade de antioxidantes. A fruta altamente perecível apresenta uma curta vida útil pós-colheita, mostrando uma grande dificuldade em sua comercialização. O objetivo do presente trabalho é desenvolver coberturas comestíveis bioativas a base de gelatina, ágar-ágár e alginato adicionadas de óleo essencial de tomilho e de laranja doce, aplicar estas por imersão em morangos e avaliar a atividade antimicrobiana de bactérias e fungos, com especial atenção ao efeito anti-*Salmonella* spp. Avaliando o efeito das coberturas nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais, determinantes da vida útil de morangos nos tempos de 1, 7 e 15 dias. Para isso será realizado a determinação do pH, acidez titulável, perda de massa e sólidos solúveis, avaliação microbiológica através da contagem de bolores e leveduras, bactérias mesófilas aeróbias, de bactérias psicrotróficas e enumeração de coliformes totais e termotolerantes e por fim a análise sensorial, conforme o método de dominância temporal das sensações a fim de, avaliar a atributos como textura, aroma e sabor em relação às características gerais dos morangos com coberturas comestíveis adicionada de óleo essencial de tomilho ou de laranja doce.

**Palavras chave:** alimentos, revestimentos, microrganismos, patógenos

## Sumário

<b>1.Introdução.....</b>	<b>24</b>
<b>2 Hipóteses .....</b>	<b>27</b>
<b>3 Objetivos .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>28</b>
<b>4 Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Morango.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2 Coberturas .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2.2 Ágar-Ágar .....</b>	<b>31</b>
<b>4.2.3 Gelatina.....</b>	<b>32</b>
<b>4.3 Óleos essenciais .....</b>	<b>32</b>
<b>4.3.1 Óleo essencial de Tomilho .....</b>	<b>33</b>
<b>5 Material e Métodos.....</b>	<b>35</b>
<b>5.1 Aquisição da amostra.....</b>	<b>35</b>
<b>5.2 Preparação, aplicação e avaliação de coberturas adicionadas de óleo essencial .....</b>	<b>35</b>
<b>5.2.1 Preparação da solução filmogênica para cobertura .....</b>	<b>35</b>
<b>5.2.2 Aplicação das soluções filmogênicas adicionadas de óleos essencial de tomilho e óleo essencial de laranja doce.....</b>	<b>36</b>
<b>5.2.3 Avaliação dos morangos com soluções filmogênicas adicionadas de óleo essencial .....</b>	<b>37</b>

<b>5.2.3.1 Avaliações Físico-químicas dos morangos com soluções filmogênicas adicionadas de óleo essencial.....</b>	<b>37</b>
<b>5.2.3.2 Avaliações microbiológicas dos morangos com soluções filmogênicas adicionadas de óleo essencial.....</b>	<b>38</b>
<b>5.2.3.3 Avaliação sensorial dos morangos com soluções filmogênicas adicionadas de óleo essencial.....</b>	<b>39</b>
<b>5.5 Análise estatística.....</b>	<b>40</b>
<b>6 Resultados e impactos esperados .....</b>	<b>41</b>
<b>7 Cronograma de atividades .....</b>	<b>42</b>
<b>8 Orçamento .....</b>	<b>43</b>
<b>Referências .....</b>	<b>44</b>

## 1 Introdução

O morangueiro (*Fragaria x Ananassa* Duch) pertence a família das Rosáceas sendo nativo das regiões de clima temperado da Europa e das Américas, possuindo um importante papel econômico. O morango produzido comercialmente trata-se de um híbrido natural, resultante de um cruzamento casual entre duas espécies, a porção comestível e suculenta do fruto tem origem do receptáculo floral e a parte central endurecida contendo sementes. O mercado consumidor tem uma grande aceitação por suas características atraentes como coloração, aroma e sabor, além de apresentar uma quantidade significativa de flavonoides com alta atividade de antioxidantes. No Brasil há uma grande produção comercial feita em vários estados com cultivares adaptadas (EMBRAPA, 2011).

O mercado vem apresentando uma demanda crescente por alimentos naturais, pouco processados, os quais, em função de diferentes variáveis relacionadas a condições de higiene e armazenamento, sofrem alterações significativas nas propriedades sensoriais e nutricionais. Neste contexto há necessidade de técnicas para aumentar a durabilidade de frutos como o morango, buscando um aumento na sua comercialização. Um dos métodos que vem sendo estudados são as coberturas comestíveis, podendo potencializar a vida útil de frutos e vegetais (MAFTOONAZAD, RAMASWAMY, *et al.*, 2007). As técnicas de coberturas e revestimentos comestíveis ainda são consideradas novas e em desenvolvimento, mesmo assim estão demonstrando resultados significativos na produção de práticas de conservação em produtos perecíveis. Devido ao aumento do interesse do setor produtivo e de logística, almeja-se que a utilização de revestimentos comestíveis seja empregada cada vez mais em média e larga escala na conservação de diversos produtos, principalmente nos de origem tropical (ASSIS, BRITTO, 2014).

Em um estudo realizado por Garcia (2009) verificou-se que morangos com uma cobertura composta por 3% de fécula de mandioca, resultaram em uma durabilidade maior. Segundo Oliveira *et al* (2008) a utilização de coberturas comestíveis em morango utilizando soro de leite, combinado ao armazenamento a 10 °C, propiciou uma redução significativa de bolores e leveduras e da perda

de peso dos frutos, mantendo características e aspectos originais do fruto, gerando uma melhor aceitação do público em relação ao produto.

Substâncias naturais de origem vegetal, que apresentam efeitos antimicrobianos como os óleos essenciais, conquistam um espaço cada vez maior entre os consumidores que buscam alimentos com menos conservantes sintéticos. Há uma expectativa que futuramente a utilização desses produtos naturais possa substituir total ou parcialmente os conservantes químicos sintéticos (BARA, 1992).

O tomilho (*Thymus vulgaris* L) originário na Europa pertencente à família das Lamiaceae, a qual possui 150 gêneros e 2800 espécies dispersas por todo o mundo, no Brasil é cultivada no sul e sudeste (MEWES, KRÜGER, *et al.*, 2008). Em alguns estudos verificou-se que o óleo essencial de tomilho é responsável por um dos efeitos antimicrobianos mais eficazes (WATTANASATCHA, RENGPIPAT, *et al.*, 2012)).

A citricultura constitui-se em uma das mais importantes cadeias produtivas do Brasil, gerando mais de 1,5 bilhões de dólares por ano, destacando-se nos setores econômico e social. Por se tratar de uma citricultura basicamente voltada para a indústria de processamento de suco para exportação, que responde por mais de 80% da demanda total da produção, as laranjas-doces (*Citrus sinensis* L. Osb.) são as variedades mais plantadas (BASTIANEL, DE OLIVEIRA, *et al.*, 2006). Os óleos essenciais cítricos podem ser obtidos como subprodutos da indústria de sucos e vem sendo testados como alternativa no controle de diferentes grupos de insetos e de microrganismos (MARTINS, ZAGO, *et al.*, 2017).

A *Salmonella* spp. é uma bactéria patogênica conhecida em todo o mundo, causadora da salmonelose, uma doença de origem alimentar que apresenta morbidade e mortalidade gerando perdas econômicas significativas, trata-se de um gênero da família *Enterobacteriaceae*, Gram-negativas, anaeróbias facultativas, com formatos de bastonetes, multiplica-se a partir de 5 °C, com temperatura ótima de 38 °C, são termossensíveis sendo destruídas quando submetidas a temperaturas de 60 °C por 15 a 20 min (FORSYTHE, 2012). Esse gênero possui duas espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica* (GRIMONT, WEILL, 2007).

Estudos onde os óleos essenciais são aplicados diretamente em alimentos tem demonstrado uma limitação sensorial de sua aplicação, já que estas substâncias na maioria das vezes modificam significativamente o sabor e o aroma do produto. Desse modo, uma opção para a utilização direta seria a inclusão de óleos essenciais em filmes comestíveis ou coberturas bioativas, que permitissem a ação do óleo sem alterar significativamente as características sensoriais do produto (DANNENBERG et al., 2017).

Neste estudo será verificada a potencialidade de coberturas bioativas desenvolvidas a base de gelatina, ágar-ágar e alginato, incorporadas com óleos essenciais de tomilho e de laranja doce, em morangos visando manter as características físico-químicas e sensoriais, além de inibir o desenvolvimento fúngico e bacteriano em especial contra *Salmonella* spp.

## 2 Hipóteses

Coberturas bioativas de gelatina, ágar-ágár e alginato incorporadas com óleos essenciais de tomilho e de laranja doce, mantêm as características físico-químicas e inibem o desenvolvimento de bactérias e fungos morangos.

Morangos com coberturas bioativas de gelatina, ágar-ágár e alginato incorporadas com óleo essencial de tomilho ou de laranja doce, apresentam aceitação para o consumo.

Morangos com coberturas bioativas de gelatina, ágar-ágár e alginato incorporadas com óleo essencial de tomilho ou de laranja doce, apresentam efeito antimicrobiano frente a *Salmonella* spp.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver coberturas comestíveis bioativas a base de gelatina, ágar-ágár e alginato adicionadas de óleo essencial de tomilho e de laranja doce em morangos com propriedades antimicrobianas especialmente contra *Salmonella* spp.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Aplicar em morangos coberturas bioativas a base de gelatina adicionadas de óleos essenciais de tomilho e de laranja doce;

Aplicar em morangos coberturas bioativas a base de ágar-ágár adicionadas de óleos essenciais de tomilho e de laranja doce;

Aplicar em morangos coberturas bioativas a base de alginato adicionadas de óleos essenciais de tomilho e de laranja doce;

Avaliar as características físico-químicas e microbiológicas de morangos com coberturas bioativas;

Verificar a aceitação de morangos com coberturas bioativas para o consumo através da análise sensorial;

Aplicar as coberturas bioativas em morangos e avaliar a atividade antibacteriana *in situ* frente a *Salmonella* spp.

## 4 Revisão Bibliográfica

### 4.1 Morango

O morango apresenta diversas características sensoriais que atraem os consumidores, como a cor, aroma e sabor. Apresenta ainda quantidades significativas de vitamina C a qual tem papel fundamental no metabolismo humano, como preservação de ossos, dentes, gengivas entre outras funções. Além destas qualidades, tornou-se uma importante opção para a cadeia produtiva, atraindo um número significativo de produtores, gerando uma demanda crescente de empregos e renda no campo. No Brasil não há informações oficiais sobre a introdução desse fruto, mas sugerem que foi por volta de 1950 no sul do estado de Minas Gerais. Ainda há uma carência de informações estatísticas sobre a produção do morango, segundo a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais (EMATER-MG), a produção do país em 2010 foi de 133,391 toneladas em uma área de 3,718 h (EMBRAPA, 2016).

O morango é um fruto que apresenta uma estrutura frágil e com alta taxa de atividade respiratória, resultando em uma conservação pós-colheita relativamente curta, apresentando uma grande dificuldade de fornecer esse alimento na forma *in natura*. Por esse motivo buscam-se alternativas para aumentar o prazo de vida útil do morango (EMBRAPA, 2016).

### 4.2 Coberturas

A utilização de coberturas e revestimentos comestíveis ainda se encontra em processo de desenvolvimento para fins comerciais, porém, vários estudos vêm mostrando bons resultados nas últimas décadas, apresentando potencial na conservação de alimentos nos quais o tempo de prateleira é reduzido (ASSIS et al., 2014).

Alguns estudos tem demonstrado a viabilidade de utilização de coberturas em morangos, como por exemplo, Costa (2009) ao utilizar coberturas de quitosana em morangos verificou benefícios em relação a qualidade durante o armazenamento a 0 °C e a 25 °C. Além disso, a adição de cloreto de cálcio ou ácido ascórbico proporcionou um ganho no controle de desenvolvimento fúngico e na manutenção da firmeza. Este estudo demonstrou que o ácido ascórbico

apresentou bons resultados relacionados a conservação e aceitabilidade, prolongando a vida útil do fruto sob refrigeração por até 12 dias e quando conservado em temperatura ambiente teve a vida útil prolongada em até 3 dias. Em um estudo com revestimentos em morangos a base de biofilmes de amido, foi possível observar uma diminuição na perda de massa do fruto. Os morangos com revestimento a base de amido de milho foram os que apresentaram a menor perda de massa no período de armazenamento. As amostras sem o revestimento apresentaram uma deterioração visível na estrutura da superfície dos frutos, ao contrário da amostra que passou pelo tratamento composto por biofilmes de mandioca e amido modificado, onde foi inexistente a deterioração do fruto (ALVES et al., 2011).

Segundo Oliveira (2017), em seu estudo com coberturas a base de quitosana combinados com óleos essenciais de *Salvia sclarea* em morangos, obteve resultados satisfatórios em relação a qualidade dos frutos armazenados refrigerados, mantendo boas características sensoriais e nutricionais, demonstrando ser uma alternativa viável em relação a custos. Mostrou-se ainda eficaz na conservação da massa, da vitamina C, da coloração e inibiu o surgimento de microrganismos indesejáveis.

#### **4.2.1 Alginato**

O Alginato apresenta um grande potencial para produção de estruturas de filmes e coberturas, por sua capacidade e características coloidais únicas, como: compactação, estabilização, suspensão, formação do filme e do gel. Essa facilidade decorre da sua origem, por ser um carboidrato colodial hidrofílico extraído com álcali diluído de várias espécies de algas *Phaeophyceae*. Uma das propriedades mais utilizadas em alginatos, encontrada apenas no próprio, é sua habilidade de reagir com cátions polivalentes, como os íons de cálcio, gerando assim géis fortes ou polímeros insolúveis (GRANT et al., 1973; KING, 1983; MOE et al., 1995).

Alginatos são copolímeros extraídos de algas marrons, ademais podem ser mucilagens secretadas por algumas espécies de bactérias, são insolúveis em água, com propriedades para formar géis junto a sais de cálcio (GONÇALVES, 2010; BOBBIO e BOBBIO, 1984).

Shigematsu et al. (2018), estudando a vida útil de uvas minimamente processadas com cobertura à base de cera de abelha e alginato de sódio, obtiveram resultados positivos quando analisado o retardo da senescência do fruto através da estabilidade da acidez titulável e dos sólidos solúveis. Na análise microbiológica da amostra com revestimento não houve contagens de *Salmonella* spp, coliformes totais e termotolerantes. A formulação das coberturas comestíveis a base de alginato de sódio propiciaram filmes com estruturas mais resistentes, trazendo assim um aumento de 54,6% no tempo de estocagem, proporcionando uma proteção ao fruto durante o seu transporte e armazenamento.

#### 4.2.2 Ágar-Ágar

O ágar apresenta registros históricos como um ficocolóide de utilização mais antiga, sendo aplicado em forma de gel pelas indústrias alimentícias. O ágar é muito utilizado em estudos microbiológicos como meio para o crescimento de microrganismos principalmente por apresentar características como não ser tóxico para os seres humanos e microrganismos, solidificar por volta dos 45 °C, derreter (fundir) em torno de 100 °C, manter-se estável durante a esterilização a 121 °C e também é inerte fisiologicamente (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2012).

O ágar-ágar pode ser extraído da parede celular de várias espécies de algas marinhas, sua maior utilização está nos meios de cultura sólidos para fungos e bactérias (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). Tem sido muito utilizado nas indústrias alimentícias, petrolíferas, farmacêuticas e biotecnológicas, por apresentar amplas características, como sua capacidade de absorção de água e uma difícil degradabilidade por microrganismos, ademais, têm uma boa consistência gelatinosa quando diluído em água quente (FANI, 2008).

O ágar diferente de outras substâncias não requer a presença de sais para gelificar. A sua fácil digestão no trato intestinal forma menos acúmulo de cinzas, o ágar torna-se um ótimo substituto para as pectinas. Por se tratar de um tipo de fibra não digerível o ágar é muito utilizado nas confecções de gelatinas, além de solidificar mais rápido que a gelatina convencional, oferece uma consistência melhor em temperatura ambiente (VASCONCELOS; et a 2013, IBERAGAR, 2010, ORNELLAS, 2006).

#### 4.2.3 Gelatina

A gelatina é um produto resultante da hidrólise ácida ou básica de colágeno, oriunda de partes animais, como ossos e peles. Trata-se de um composto de longas cadeias de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, por ser facilmente solúvel em água e produzida em grande escala por um baixo custo, é muito utilizada pelas indústrias farmacêuticas e alimentícias, favorecendo-se de suas diversas propriedades (CARVALHO, 2002). Apresenta entre os seus aminoácidos 33% de glicina, 20% de prolina e hidroxiprolina além de 11% de alanina (ROGERS, 2001).

Filmes a base de gelatina são os mais recomendados quando comparados com filmes convencionais como os de amido de milho, pois proporcionam aparência mais atrativa, brilhante e transparente, assim dando destaque e valorizando o fruto. A base de gelatina apresenta maior tensão de ruptura, portanto uma melhor proteção ao alimento (ALVES et al, 2015).

Em um estudo utilizando filmes biodegradáveis de recobrimento aplicados em morangos, empregou-se diferentes soluções para recobrimento, buscando a conservação de massa dos frutos, pode-se verificar o melhor resultado no composto de gelatina e glicerol dissolvidos em água destilada, os quais destacam-se por serem coberturas comestíveis biodegradáveis promovendo barreira contra gases, além de barreiras mecânicas, prolongando a vida pós-colheita dos morangos (RICARDO et al 2014).

D'Avila (2010) estudando biofilmes à base de gelatina, aplicado na conservação de frutos de mirtilo, encontrou resultados significativos. O biofilme de gelatina atuou como uma barreira na perda de água dos frutos, trazendo assim uma contenção da perda de massa em comparação ao grupo controle.

#### 4.3 Óleos essenciais

Óleos essenciais podem ser utilizados como agentes antimicrobianos, antifúngicos e antiparasitários, em função disso possuem uma grande participação na produção de fármacos para o tratamento de doenças infecciosas. É um produto natural, de menor custo e baixo risco de toxicidade, assim gerando menos reações adversas para o nosso organismo, além disso,

apresentam uma quantidade significativa de compostos que atuam no combate de agentes infecciosos, comprovados cientificamente (SARTO et al., 2014).

Os óleos essenciais além de reduzirem os riscos de contaminação dos alimentos por sua ação bactericida podem diminuir a utilização de aditivos químicos sintéticos, tendo potencial para atuar na produção de alimentos com menos riscos à saúde humana. Os óleos essenciais podem também contribuir com interessantes atributos sensoriais deixando os alimentos com agradável palatabilidade por sua interação com os substratos (MONTES et al., 2013).

Silva et al. (2013) estudando óleo essencial de orégano frente a *Salmonella Enteritidis*, encontrou resultados positivos na inibição deste patógeno, independe da origem e da época do ano de cultivo do orégano.

#### **4.3.1 Óleo essencial de Tomilho**

O tomilho (*Thymus vulgaris*) é encontrado em regiões secas e áridas, apresenta arbustos de pequeno porte com caules compactos e poucos ramos (CASTRO e CHEMALE, 1995).

Segundo Silva e Rangel (2010), ao realizar uma análise fotoquímica do extrato das folhas de tomilho, identificaram a presença de fenóis, flavonoides, terpenos, taninos e cumarinas, verificaram ainda um potente efeito antimicrobiano, principalmente contra *Staphylococcus aureus* o qual é uma bactéria Gram-positiva que pode apresentar multirresistência a antibióticos.

Os óleos essenciais de tomilho têm potencial para serem utilizados como aditivos naturais devido as suas atividades antibacterianas e sua disponibilidade na natureza, ganhando espaço na aplicação da indústria de alimentos com o objetivo de controlar e aumentar a vida de prateleiras dos alimentos (BENINCÁ, 2018).

#### **4.3.2 Óleo essencial de laranja doce**

O Gênero Citrus da Família *Rutaceae* apresenta uma grande variedade de plantas, como as laranjas, tangerinas e limões. Sendo originarias de regiões subtropicais do sul da Ásia, apresentam árvores de porte médio em formato arredondado com folhas e flores aromáticas. Os seus frutos apresentam um alto teor de vitamina C, vitamina A e também as vitaminas do complexo B, além de

sais minerais, cálcio, potássio, sódio, fósforo e ferro (INSTITUTO DE AGRONÔMIA DE CAMPINAS, 2005).

Os óleos essenciais do Gênero *Citrus* são extraídos do pericarpo do fruto, obtidos de um subproduto da indústria de sucos. A uma grande utilização dos derivados de óleos essenciais de laranja na fabricação de diversos produtos, partindo de sabonetes a produtos farmacêuticos (BIZZO et al., 2009).

#### **4.6 *Salmonella* spp**

*Salmonella* é uma bactéria patogênica causadora da salmonelose, trata-se de um gênero da família *Enterobacteriaceae*, Gram-negativas, anaeróbias facultativas, com formatos de bastonetes. *Salmonella* multiplica-se em um ambiente favorável a partir de 5 °C, com temperatura ótima de crescimento em torno de 38 °C, por serem termossensíveis podem ser destruídas a partir de 60 °C entre 15 a 20 min. Podem facilmente multiplicar-se na superfície de brotos de alfada, de tomates, de cacau e de frutas. Podendo sobreviver ao trânsito gástrico quando associada a alimentos nos quais alguns fatores como baixa atividade de água e alto teor de gordura conferem proteção durante o transito pelo estômago (FORSYTHE, 2013).

Huang et al. (2012) estudaram a sobrevivência de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp em morangos congelados a -18 °C durante 12 semanas. Os resultados mostraram que ambos os patógenos persistiram por 4 semanas nos frutos.

Em um panorama mundial uma carga global de gastroenterite por *Salmonella* estima-se que 93,8 milhões de casos de gastroenterite chegando a 155.000 mortes por ano, estimando-se que 80,3 milhões desses casos eram de origem alimentar (MAJOWICZ, MUSTO, et al., 2010).

## 5 Material e Métodos

### 5.1 Aquisição da amostra

Serão utilizados os óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e de laranja doce (*Citrus aurantium* var. *Dulcis*), obtidos comercialmente da empresa Ferquima, Indústria e Comércio de Óleos Essenciais, acondicionados em frasco âmbar, lacrados, com volume total de 100 mL. Serão adquiridos frutas (morangos) de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) obtidos da cooperativa Coopammb (Cooperativa dos Produtos Agrícolas do Monte Bonito) da região de Pelotas-RS

### 5.2 Preparação, aplicação e avaliação de coberturas adicionadas de óleo essencial

Serão preparadas soluções filmogênicas de gelatina, ágar-ágár e alginato adicionadas de óleo essencial de tomilho e óleo essencial de laranja doce. Estas soluções serão aplicadas por imersão em morangos visando avaliar o efeito antimicrobiano frente às bactérias e fungos, com especial atenção ao efeito anti-*Salmonella* spp.

#### 5.2.1 Preparação da solução filmogênica para cobertura

A solução filmogênica de gelatina será preparada de acordo com a metodologia proposta por GALINDO, 2017, com concentração de gelatina (4% m/v), óleo essencial (1,5 %); glicerol (1,0 %) e tween - 0,1 %.

Será dissolvida a gelatina com adição do glicerol sob agitação magnética e aquecimento à 55º C por 35 min. Posteriormente será feita a mistura das duas soluções, na proporção de 1:1, com incorporação do óleo essencial de tomilho ou laranja doce e Tween 80 e será homogeneizada por 4min.

A solução filmogênica de ágar-ágár comestível será preparada de acordo com a metodologia proposta por GIMÉNEZ et al. (2013) e ROCHA et al. (2016), com algumas modificações. Os filmes serão elaborados com 1,5 g de ágar-ágár comestível em 100 mL de água destilada sob agitação constante a 90 °C durante 30 min. Após, será adicionado o glicerol, como plastificante (1%; g/100g de ágar) e homogeneizado durante 20 min. Para a obtenção dos filmes incorporados com os óleos essenciais, será adicionado 0,1 g de óleo essencial, após o

arrefecimento da solução filmogênica (SF) de ágar a 40 °C e homogeneizados durante 5 min, após será realizada secagem a 40 °C durante 16 h.

A solução filmogênica de alginato será preparada de acordo com a metodologia proposta por SHIGEMASU, 2017 com concentração de alginato de sódio (1,5% m/v), óleo essencial de tomilho (1,5 %); glicerol (0,75 %) e tween80 (0,05 %).

Para tanto, o alginato de sódio será previamente dissolvido em água aquecida a 70°C e agitado mecanicamente a 2400 rpm por 5 min até sua completa dissolução. Será adicionado glicerol, óleo essencial de tomilho ou laranja doce e Tween 80, homogeneizando-se novamente no agitador mecânico por 3 min até a sua total dissolução.

### **5.2.2 Aplicação das soluções filmogênicas adicionadas de óleos essencial de tomilho e óleo essencial de laranja doce**

As amostras de morango serão imersas nas respectivas soluções filmogênicas por 1 min e, após, serão secas por 60 min, embaladas em PEBD (Polietileno de Baixa Densidade) e armazenadas em temperatura de refrigeração (≤ 7°C) até a retirada das amostras.

As coberturas serão aplicadas na forma de 10 tratamentos, conforme descrito a seguir.

Tratamento 1 - morangos preparados, com cobertura de gelatina com óleo essencial de tomilho.

Tratamento 2 - morangos preparados, com cobertura de gelatina com óleo essencial de laranja doce.

Tratamento 3 - morangos preparados, com cobertura de gelatina sem óleo essencial.

Tratamento 4 - morangos preparados, com cobertura de ágar-ágar com óleo essencial de tomilho.

Tratamento 5 - morangos preparados, com cobertura de ágar-ágar com óleo essencial de laranja doce.

Tratamento 6 - morangos preparados, com cobertura de ágar-ágar sem óleo essencial.

Tratamento 7 - morangos preparados, com cobertura de alginato com óleo essencial de tomilho.

Tratamento 8 - morangos preparados, com cobertura de alginato com óleo essencial de laranja doce.

Tratamento 9 - morangos preparados, com cobertura de alginato sem óleo essencial.

Tratamento 10 - morangos preparados sem cobertura e sem óleo essencial.

### **5.2.3 Avaliação dos morangos com soluções filmogênicas adicionadas de óleo essencial**

Os produtos depois de elaborados de acordo com os tratamentos serão armazenados por até 15 dias a temperatura  $\leq 7^{\circ}\text{C}$ . A partir de cada um dos produtos será retirada uma amostra de 25 g em três tempos, logo após a elaboração do produto, sete dias após a elaboração dos produtos e quinze dias após a elaboração. A avaliação terá pelo menos duas repetições.

#### **5.2.3.1 Avaliações Físico-químicas dos morangos com soluções filmogênicas adicionadas de óleo essencial**

As análises físico-químicas serão realizadas de acordo com a metodologia proposta por Adolfo Lutz, 2008.

##### **pH**

Será pesado 10 g da amostra em um béquer e diluído com 100 mL de água. Após agitação a determinação do pH será feita pelo aparelho pHmetro.

##### **Acidez Titulável**

Será pesado de 1 a 5 g da amostra, transferido para um frasco Erlenmeyer de 125mL com o auxílio de 50mL de água. Adicionado de 2 a 4 gotas da solução fenolftaleína e titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1 ou 0,01M, até coloração rósea.

##### **Perda de massa**

A massa das amostras será determinada pesando-se, diariamente em balança eletrônica com precisão de 0,001 g. A perda de massa será calculada por meio da Equação:

$[(\text{massa inicial} - \text{massa a cada intervalo de tempo}) / (\text{massa inicial})] \times 100$ .

### **Sólidos solúveis**

Será transferido de 3 a 4 gotas da amostra homogeneizada para o prisma do refratômetro. Será circulado água à temperatura constante pelo equipamento a 20 °C, observando se a temperatura permanece constante. Após um minuto, leia diretamente na escala os graus Brix.

#### **5.2.3.2 Avaliações microbiológicas dos morangos com soluções filmogênicas adicionadas de óleo essencial**

As determinações microbiológicas, foram realizadas de acordo com as recomendações de DOWNES & ITO (2001) e SILVA *et al.* (2007).

#### **Contagem de bolores e leveduras**

Para a contagem de bolores e leveduras o meio utilizado será o Ágar Batata Dextrose, acidificado (pH 3,5-4,0) com ácido tartárico a 10%, com incubação de 30 °C por 3-5 dias.

#### **Contagem de bactérias mesófilas aeróbias**

A enumeração de bactérias mesófilas aeróbias será realizada utilizando-se semeadura em Agar Para Contagem Total (Plate Count Agar-PCA) com incubação a 37 °C por 24horas.

#### **Contagem de bactérias psicrotróficas**

A enumeração de bactérias psicrotróficas será realizada utilizando-se semeadura em Agar Para Contagem Total (Plate Count Agar - PCA) com incubação a 7° C por 10 dias.

#### **Enumeração de coliformes totais e termotolerantes**

Para a enumeração de coliformes totais e termotolerantes será utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP). A análise presuntiva de coliformes será realizada em Caldo Lauril Sulfato de Sódio (LST), com incubação por 48 h a 35 °C. Será realizada também a enumeração de coliformes totais em Caldo

Lactosado Bile Verde Brilhante, com incubação a 35 °C por 24 a 48 h. A enumeração de coliformes termotolerantes será feita em Caldo *Escherichia coli*, (EC) com incubação a 45,5 °C por 24h.

### **5.2.3.3 Avaliação sensorial dos morangos com soluções filmogênicas adicionadas de óleo essencial**

Para a análise sensorial será utilizado o método de dominância temporal das sensações, proposto inicialmente por Pineau et al. (2003), sendo este um método descritivo temporal onde vários atributos sensoriais são avaliados ao longo do tempo de ingestão do alimento como textura, aroma e sabor dos morangos com coberturas comestíveis adicionados de óleos essenciais. A análise sensorial será realizada após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pelotas.

## **5.3 Avaliação do potencial antimicrobiano frente a *Salmonella* spp.**

Os morangos sem cobertura (controle positivo) e com adição das coberturas com óleos essencial serão submetidos avaliação da atividade antimicrobiana contra *Salmonella* spp. As amostras serão experimentalmente contaminadas serão adicionados separadamente inóculos de 1 mL (padronizados na concentração D.O 0,5 na escala de McFarland que equivale  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) de *Salmonella* spp. Os produtos após elaborados de acordo com os tratamentos listados a seguir serão armazenados por até 15 dias a temperatura  $\leq 7^{\circ}\text{C}$ . A partir de cada um dos produtos será retirada uma amostra de 25 g em três tempos, logo após a elaboração do produto, sete dias após a elaboração do produto e quinze dias após a elaboração e submetidas a avaliação da presença de *Salmonella* spp. Esta etapa será realizada com no mínimo três repetições.

Para correta avaliação serão realizados os seguintes tratamentos:

Tratamento 1 - morangos preparados, com cobertura de gelatina com óleo essencial de tomilho com contaminação intencional bacteriana.

Tratamento 2 - morangos preparados, com cobertura de gelatina com óleo essencial de laranja doce com contaminação intencional bacteriana.

Tratamento 3 - morangos preparados, com cobertura de ágar-ágar com óleo essencial de tomilho com contaminação intencional bacteriana.

Tratamento 4 - morangos preparados, com cobertura de ágar-ágar com óleo essencial de laranja doce com contaminação intencional bacteriana.

Tratamento 5 - morangos preparados, com cobertura de alginato com óleo essencial de tomilho com contaminação intencional bacteriana.

Tratamento 6 - morangos preparados, com cobertura de alginato com óleo essencial de laranja doce com contaminação intencional bacteriana.

Tratamento 7 - morangos preparados sem cobertura com contaminação intencional bacteriana.

Tratamento 8 - morangos preparados sem cobertura sem contaminação intencional bacteriana.

## **5.5 Análise estatística**

Os resultados serão avaliados estatisticamente através de Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Diferença Mínima Significativa de Fisher ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o programa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc.). As contagens bacterianas terão seus valores logaritmizados antes da análise estatística.

## 6 Resultados e impactos esperados

Com este estudo espera-se que as coberturas com o óleo essencial de tomilho e laranja doce apresentem efeito antimicrobiano, em especial contra *Salmonella* spp. e que permitam o prolongamento da vida útil dos morangos e tenham aceitação sensorial.

## 7 Cronograma de atividades

As atividades serão realizadas de acordo com o exposto na Quadro 1.

**Quadro 1.** Cronograma de atividades

Atividades	1º B	2º B	3º B	4º B	5º B	6º B
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X
Aquisição das amostras	X					
Elaboração e aplicação das coberturas		X	X	X	X	
Avaliação Físico-Química		X	X			
Armazenamento e avaliação microbiológica		X	X			
Avaliação sensorial			X	X		
Avaliação do potencial anti- <i>Salmonella</i> spp				X	X	
Análise estatística				X	X	X
Elaboração do artigo						X
Defesa da dissertação						X

## 8 Orçamento

O orçamento será realizado com recursos do PROAP-CAPES, e dos orientadores oriundos de outras fontes de financiamento, conforme exposto no Quadro 2.

**Quadro 2.** Orçamento do projeto

Descrição	Quantidade	Valor Total (R\$)
Ácido tartárico a 10%,	500 g	25,00
Ágar Batata Dextrose (BDA)	500 g	235,00
Ágar-ágár em pó	500 g	247,00
Alginato de sódio	250 g	61,90
Caldo de Escherichia coli	500 g	-
Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante	500 g	440,00
Caldo Lauril Sulfato de Sódio	500 g	265,00
Cloreto de Sódio (NaCl)	500 g	13,90
Fita indicador pH	1 cx	27,5
Gelatina em pó	500 g	76,70
Glicerol	500 ml	28,90
Hidróxido de sódio (NaOH) 0,1	500 g	12,90
Placa de Petri Descartável 90x15mm	Pct	3,95
Plate Count Agar (PCA)	500 g	345,00
Solução fenolftaleína	1 kg	32,00
Tween 80 (Polisorbato)	1 l	95,70
<b>TOTAL</b>		<b>1.910</b>

## Referências

- ALVES, A. I., SARAIVA, S. H., LUCIA, S. M. D., *et al.* "Qualidade De Morangos Envolvidos Com Revestimento Comestível Antimicrobiano À Base De Diferentes Fontes De Amido", **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, p. 1519–1526, 2011..
- ASSIS, O. B. G., BRITTO, D. de. "Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações", **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 2, p. 87–97, jun. 2014. DOI: 10.1590/bjft.2014.019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/bjft.2014.019>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- BARA, M. **Avaliação do efeito inibidor de condimentos no desenvolvimento de Yersinia enterocolitica.** 1992. 1992. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000051&pid=S1413-7054200400030002700002&lng=en](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000051&pid=S1413-7054200400030002700002&lng=en). Acesso em: 15 mar. 2021.
- BARREIRO, E. **Utilização de revestimento de cobertura comestível a base de pectina de baixa metoxilação e ácido cinâmico em morango refrigerado.** . [S.I.], Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 8 jun. 2016. Disponível em: <http://repositorio.roca.utfpr.edu.br:8080/jspui/handle/1/14748>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- BASTIANEL, M., DE OLIVEIRA, A. C., CRISTOFANI, M., *et al.* "Genetic diversity among hybrids of sweet orange and "Murcott" tangor evaluated by fAFLP and RAPD markers", **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 779–784, 2006. DOI: 10.1590/s0100-204x2006000500009. .
- BELTRÃO, F. **Desenvolvimento e avaliação de revestimento comestível com adição de antifúngicos naturais para a proteção de morangos.** 2017. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2017. Disponível em: <http://repositorio.roca.utfpr.edu.br:8080/jspui/handle/1/11400>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- BIZZO, H. R., ANA MARIA, C. H., REZENDE, C. M. "Oleos essenciais no brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas", **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, 2009. DOI: 10.1590/S0100-40422009000300005. .
- BORGES, C. D., MENDONÇA, C. R. B., ZAMBIAZI, R. C., *et al.* "Conservação de morangos com revestimentos à base de goma xantana e óleo essencial de sálvia", **Bioscience Journal**, v. 29, n. 5, p. 1071–1083, 2013. .
- CALO, J. R., CRANDALL, P. G., O'BRYAN, C. A., *et al.* **Essential oils as antimicrobials in food systems - A review.** **Food Control**. [S.I: s.n.], 2015

- CHITARRA, M. I. F., CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças - fisiologia e manuseio.** [S.l: s.n.], 1990.
- COSTA, C. S. da. **Prolongamento da vida útil e qualidade pós-colheita de morangos pelo emprego de cobertura comestível.** . [S.l: s.n.], 2009.
- CRISTINA BENINCÁ, M. **Efeito Inibitório De Óleos Essenciais Contra *Staphylococcus Aureus* Multirresistentes e Formadores De Biofilmes.** 2018. Universidade de Passo Fundo, 2018. Disponível em: <http://tede.upf.br/jspui/handle/tede/1654>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- DA, A. O., HAERTEL, S. **Compostos bioativos e características físico-químicas de morangos cv. Camarosa minimamente processados submetidos a revestimentos à base de gelatina, xantana e óleo de canola.** 2014. Universidade Federal de Pelotas, 2014. Disponível em: <http://repositorio.ufpel.edu.br:8080/handle/ri/2707>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- DE OLIVEIRA, C. M., SILVA, O. F., DA SILVA, M. C., et al. "Utilização Do Soro De Leite Bovino Como Revestimento Protetor Em Morangos", **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 2, 2008. DOI: 10.5380/cep.v26i2.13273. .
- EMBRAPA. **A CULTURA DO MORANGO 2 a edição revista e ampliada.** [S.l: s.n.], 2011.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia Segurança Alimentos dos da.** [S.l: s.n.], 2012.
- GARCIA, L. C. **Aplicação De Coberturas Comestíveis Em Morangos Minimamente Processados.** 2009. 2009.
- GREENWALD, A. G., MCGHEE, D. E., SCHWARTZ, J. L. K. "Measuring individual differences in implicit cognition: The implicit association test", **Journal of Personality and Social Psychology**, v. 74, n. 6, p. 1464–1480, 1998. DOI: 10.1037/0022-3514.74.6.1464. .
- GRIMONT, P., WEILL, F.-X. "Antigenic formulae of the *Salmonella* servovars: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*", **9th Edition, Institute Pasteur**, 2007. .
- KORTE, K. P., FAVARÃO, S. C. M. "Efeito da gelatina incolor e comercial associada a extratos vegetais como revestimento comestível na pós-colheita do morango", **Campo Digital**, v. 11, n. 1, p. 08–15, 2016. .
- MAFTOONAZAD, N., RAMASWAMY, H. S., MOALEMIYAN, M., et al. "Effect of

- pectin-based edible emulsion coating on changes in quality of avocado exposed to *Lasiodiplodia theobromae* infection", **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 2, p. 341–349, 2007. DOI: 10.1016/j.carbpol.2006.11.020. .
- MAJOWICZ, S. E., MUSTO, J., SCALLAN, E., *et al.* "The global burden of nontyphoidal salmonella gastroenteritis", **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 6, p. 882–889, 2010. DOI: 10.1086/650733. .
- MARTINS, G. D. S. O., ZAGO, H. B., COSTA, A. V., *et al.* "Chemical composition and toxicity of citrus essential oils on *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae)", **Revista Caatinga**, v. 30, n. 3, p. 811–817, 2017. DOI: 10.1590/1983-21252017v30n330rc. .
- MARTINS ROCHA, T., MURILLO, ;, JÚNIOR, F., *et al.* "Uso de Revestimentos Comestíveis na Preservação da Qualidade de Carambola (*Averrhoa carambola* L.) Minimamente Processada", 2010. .
- MENDONÇA, J. N. DE. **AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE MORANGOS RECOBERTOS COM DIFERENTES FILMES BIODEGRADÁVEIS DURANTE SUA SHELF-LIFE**". 2016. 2016.
- MEWES, S., KRÜGER, H., PANK, F. "Physiological, morphological, chemical and genomic diversities of different origins of thyme (*Thymus vulgaris* L.)", **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 55, n. 8, p. 1303–1311, 2008. DOI: 10.1007/s10722-008-9329-7. .
- MONTES, S. de S., NETA, L. G. S., CRUZ, R. S. "Óleos essenciais em embalagens para alimentos - Revisão de literatura de 2000 a 2012. | Montes | Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia - ISSN: 1984-5693", **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, 2013. Disponível em: <https://revistascientificas.ifrj.edu.br/revista/index.php/revistapct/article/view/368>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- PERDONES, A., SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L., CHIRALT, A., *et al.* "Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry", **Postharvest Biology and Technology**, v. 70, p. 32–41, 2012. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2012.04.002. .
- PERSICO, P., AMBROGI, V., CARFAGNA, C., *et al.* "Nanocomposite polymer films containing carvacrol for antimicrobial active packaging", **Polymer Engineering and Science**, v. 49, n. 7, p. 1447–1455, 2009. DOI: 10.1002/pen.21191. .

- PRATES, M. F. O., ASCHERI, D. P. R. "Efeito da cobertura de amido de fruta-de-lobo e sorbitol e do tempo de armazenamento na conservação pós-colheita de frutos de morango", **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 21–32, 2011. DOI: 10.5380/cep.v29i1.22746. .
- RICARDO, L. P., MORAIS, M. M., ROSA, G. S. DA. "Estudo De Filmes Biodegradáveis De Recobrimento Aplicado Em Morangos". 2015. **Anais** [...] [S.I: s.n.], 2015. p. 5459–5466. DOI: 10.5151/chemeng-cobeq2014-0597-24776-162407.
- ROGERS, M. D. H. **Rheological properties of gelatin/starch composite gels**. 2001. 2001.
- SARTO, M. P. M., ZANUSSO JUNIOR, G. "ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS", **Revista UNINGÁ Review**, 2014. Disponível em: <http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1559/1170>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- SCARTAZZINI, L. **Estudo da atividade antifúngica do óleo essencial de menta incorporado em coberturas comestíveis à base de gelatina para aplicação em morango (Fragaria x ananassa)**. 2018. 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/198790>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- TAVARES, T. S. **Revestimento de quitosana na manutenção da qualidade pós-colheita de morangos**. 2015. UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 2015. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/5575>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- UGALDE, M. L. **Biofilmes ativos com incorporação de óleos essenciais**. 2014. 168 f. 2014. Disponível em: [http://www.uricer.edu.br/cursos/arq\\_trabalhos\\_usuario/2568.pdf](http://www.uricer.edu.br/cursos/arq_trabalhos_usuario/2568.pdf). Acesso em: 15 mar. 2021.
- VELICKOVA, E., WINKELHAUSEN, E., KUZMANOVA, S., et al. "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, n. 2, p. 80–92, 2013. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.02.004. .
- WATTANASATCHA, A., RENGPIPAT, S., WANICHWECHARUNGRUANG, S. "Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent", **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, n. 1–2, p. 360–365, 2012. DOI:

10.1016/j.ijpharm.2012.06.017.

## 9 Relatório de Campo

Optou-se pela cobertura de gelatina por suas diversas características já conhecidas e comprovadas, alem de ser um produto de fácil acesso. Não foi realizada as análises de *Salmonella* nos tempos de 8 dias e de 15 dias em função do início da pandemia de COVID-19 que nos obrigou a adotar o isolamento e distanciamento social e interromper as atividades experimentais no laboratório.

Em relação a avaliação sensorial, também em função da pandemia de COVID-19, foi alterada, adotando uma metodologia de análise online que não exigiu contato pessoal.

## 10 Artigo

### **Desenvolvimento de cobertura bioativa de gelatina para morangos adicionada de óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e de laranja doce (*Citrus aurantium* var. *Dulcis*) com propriedades antimicrobianas e estudo de consumo por associação implícita**

#### **1. Introdução**

O morango tem uma participação importante na agroindústria brasileira, podendo ser consumido tanto *in natura* quanto processado. É originário de regiões de clima temperado e pode ser cultivado em grande parte do território brasileiro, alcançando uma produção significativa (EMBRAPA, 2011).

A grande demanda do mercado por produtos considerados “mais saudáveis”, faz crescer o interesse por métodos de conservação mais sustentáveis, com menor utilização de conservantes químicos sintéticos, que aumentem a durabilidade e a vida de prateleiras dos alimentos, porém, sem trazer riscos à saúde dos consumidores, neste contexto a utilização de coberturas comestíveis bioativas pode ser uma saída para atender as demandas crescentes do mercado cada vez mais exigente (MAFTOONAZAD, RAMASWAMY, *et al.*, 2007).

Nesse sentido, estudando coberturas comestíveis, combinadas ao armazenamento em baixa temperatura em morangos, tem demonstrado eficácia na inibição de fungos, além de manter características importantes dos frutos aumentando assim, a sua aceitação ao consumidor (DE OLIVEIRA, SILVA, *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais em função de suas características bioativas, dentre elas, o efeito antimicrobiano, apresentam potencial para serem utilizados como uma alternativa eficiente e sustentável aos conservantes químicos sintéticos, sendo a cobertura uma forma possível de aplicação desses óleos (CALO, CRANDALL, *et al.*, 2015).

A utilização de óleo essencial de tomilho vem mostrando um dos melhores resultados antimicrobianos entre os óleos essenciais (WATTANASATCHA,

RENGPIPAT, *et al.*, 2012). Já os óleos essenciais cítricos são obtidos como subprodutos da indústria, com aroma muito agradável, também vêm sendo testados como alternativa antimicrobiana (MARTINS, ZAGO, *et al.*, 2017).

*Salmonella* app. é uma bactéria patogênica que pode causar doença de origem alimentar, sua morbidade e mortalidade tem alcançado números elevados em diversos países (FORSYTHE, 2012).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo desenvolver coberturas comestíveis bioativas em morangos a base de gelatina, adicionada de óleo essencial de tomilho e de laranja doce, com propriedades antimicrobianas especialmente contra *Salmonella* spp e estudo de consumo por associação implícita

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Aquisição da amostra**

Foram utilizados óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e de laranja doce (*Citrus aurantium* var. *Dulcis*), obtidos comercialmente da empresa Ferquima, Indústria e Comércio de Óleos Essenciais, acondicionados em frasco âmbar, lacrados, com volume total de 100 mL. Foram adquiridas frutas (morangos) de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) obtidos no comércio varejista da cidade de Pelotas-RS, Brasil.

### **2.2 Preparação, aplicação e avaliação de coberturas adicionadas de óleo essencial**

#### **2.2.1 Preparação da solução filmogênica para cobertura**

A solução filmogênica de gelatina foi preparada de acordo com a metodologia proposta por Galindo (2017), com concentração de gelatina (4%), óleo essencial (1,5 %); glicerol (1,0 %) e tween 20 (0,1 %).

Dissolveu-se a gelatina com adição de glicerol sob agitação magnética e aquecimento à 55°C por 35 min. Posteriormente foi incorporado o óleo essencial de tomilho e/ou laranja doce e Tween 80 e foi homogeneizada por 4min.

## **2.2.2 Aplicação das soluções filmogênicas adicionadas de óleos essenciais de tomilho e/ou de laranja doce**

As amostras de morango foram imersas nas respectivas soluções filmogênicas por 1 min e, após, a secagem por 60 min, embaladas em PEBD (Polietileno de Baixa Densidade) e armazenadas em temperatura de refrigeração ( $\leq 7^{\circ}\text{C}$ ) até a retirada das amostras.

As coberturas foram aplicadas na forma de 4 tratamentos, conforme descrito a seguir.

Tratamento 1 - morangos preparados, com cobertura de gelatina com óleo essencial de tomilho.

Tratamento 2 - morangos preparados, com cobertura de gelatina com óleo essencial de laranja doce.

Tratamento 3 - morangos preparados, com cobertura de gelatina sem óleo essencial.

Tratamento 4 - morangos preparados sem cobertura e sem óleo essencial.

## **2.2.3 Avaliação dos morangos com soluções filmogênicas adicionadas de óleo essencial**

Os produtos depois de elaborados, de acordo com os tratamentos, foram armazenados por até 15 dias a temperatura  $\leq 7^{\circ}\text{C}$ . Para todas as análises, a partir de cada um dos produtos, foi retirada uma amostra de 25 g em três tempos, um dia após a elaboração do produto, oito dias após a elaboração dos produtos e quinze dias após a elaboração. A avaliação foi realizada com pelo menos duas repetições.

### **2.2.3.1 Avaliações Físico-químicas dos morangos com soluções filmogênicas adicionadas de óleo essencial**

As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Adolfo Lutz, (IAL, 2008).

#### **pH**

Foram pesados 10 g da amostra em um béquer e diluídos com 100 mL de água destilada. Após agitação com dissolução e homogeneização completa a

determinação do pH foi feita utilizando um pHmetro de bancada, modelo (Mca-150)

### **Acidez Titulável**

Foram pesados de 1 a 5 g da amostra, transferidos para um frasco erlenmeyer de 125mL com o auxílio de 50mL de água destilada. Adicionou-se de 2 a 4 gotas da solução fenolftaleína e titulou-se com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, até coloração rósea.

### **Perda de massa**

A massa das amostras foi determinada pesando-se, diariamente em balança eletrônica com precisão de 0,001 g. A perda de massa foi calculada por meio da Equação:

$$[(\text{massa inicial} - \text{massa a cada intervalo de tempo}) / (\text{massa inicial})] \times 100.$$

### **Sólidos solúveis**

Foram transferidos de 3 a 4 gotas de amostra homogeneizada (da mesma forma como foi realizada na determinação do pH) para o prisma de um refratômetro modelo (Itref95). Foi circulado água destilada à temperatura constante pelo equipamento a 20 °C, observando se a temperatura permanecia constante. Após 1 minuto, foi realizada a leitura diretamente na escala em graus Brix.

#### **2.2.3.2 Avaliações microbiológicas dos morangos com soluções filmogênicas adicionadas de óleo essencial**

As determinações microbiológicas, foram realizadas de acordo com as recomendações de Downes & Ito (2001) e Silva *et al.* (2007). As amostras foram homogeneizadas e diluídas com água peptonada estéril e submetidas as análises microbiológicas.

### **Contagem de fungos**

Para a contagem de fungos utilizou-se placas de petri com o meio Ágar Batata Dextrose, acidificado (pH 3,5-4,0) com ácido tartárico a 10%, o mesmo

foi semeado com diluições seriadas das amostras e incubado de 30 °C por 3-5 dias.

### **Contagem de bactérias mesófilas aeróbias**

A enumeração de bactérias mesófilas aeróbias foi realizada utilizando-se semeadura em Agar Para Contagem Total (Plate Count Agar-PCA) com incubação a 37 °C por 24 h.

### **Contagem de bactérias psicrotróficas**

A enumeração de bactérias psicrotróficas foi realizada utilizando-se semeadura em Ágar Para Contagem Total (Plate Count Agar - PCA) com incubação a 7°C por 10 dias.

### **Enumeração de coliformes termotolerantes**

Na enumeração de coliformes termotolerantes foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP). A análise presuntiva de coliformes foi realizada em Caldo Lauril Sulfato de Sódio (LST), com incubação por 48 h a 35 °C. A enumeração de coliformes termotolerantes foi feita em Caldo *Escherichia coli*, (EC) com incubação a 45,5 °C por 24h.

## **2.3 Avaliação do potencial antimicrobiano frente a *Salmonella* spp.**

Os morangos sem cobertura (controle positivo) e com adição das coberturas com óleos essenciais foram submetidos avaliação da atividade antimicrobiana contra *Salmonella* spp. As amostras foram experimentalmente contaminadas, para isso foram adicionados separadamente inóculos de 1 mL (padronizados na concentração D.O. 0,5 na escala de McFarland que equivale  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) de *Salmonella* spp. Os produtos após elaborados de acordo com os tratamentos listados a seguir. A partir de cada um dos produtos foi retirada uma amostra de 25 g, um dia após a elaboração do produto, e submetida a avaliação da presença de *Salmonella* spp. Esta etapa foi realizada com no mínimo três repetições.

Para correta avaliação foram realizados os seguintes tratamentos:

M1– Morango controle sem cobertura;  
M2 – Morango somente com cobertura de gelatina;  
M3 – Morango sem cobertura e contaminado com *Salmonella* spp;  
M4 – Morango contaminado com *Salmonella* spp e depois imerso na cobertura de gelatina;  
M5 – Morango com cobertura de gelatina e depois contaminado de *Salmonella* spp. Para o isolamento de *Salmonella* spp. foi realizado pré-enriquecimento em água peptonada tamponada a 37°C por 24 h, enriquecimento seletivo em Caldo Rappaport-Vassiliadis a 42°C por 24 h e Caldo Tetratrationato a 37°C por 24 h. Em seguida, foi feito semeadura em placas de Ágar Desoxicolato-Lisina-Xilose (XLD) e Ágar Hektoen-Enteric (HE), sendo ambos incubados por 24 h a 37°C. Colônias típicas foram submetidas à identificação bioquímica em Ágar Tríplice Ferro (TSI), Ágar Lisina Ferro (LIA) e Ágar Urease a 37°C por 24 h.

## **2.4 Estudo de consumo por associação implícita dos morangos com soluções filmogênicas adicionadas de óleo essencial**

Foi realizada a análise sensorial após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pelotas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética (5317 – UFPEL) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas sob o número CAAE 30622820.8.0000.5317. O contexto pandêmico que envolveu o ano de 2020 acabou por provocar uma série de problemas na dinâmica dos procedimentos tanto acadêmicos quanto na área de pesquisa. Com o presente estudo não foi diferente, os impactos foram tanto no que se refere a sua continuidade e finalização.

A metodologia necessitou de ajustes, bem como a forma de análise dos seus resultados. Diante disso, foi necessário buscar novas técnicas que se aplicassem ao trabalho, sendo o caso da aplicação de neurosensorial através do Teste de Associação Implícita (TAI), construído com o objetivo original de estudar ações, atitudes e conceitos. O TAI mensura a força associativa gerada automaticamente a partir de dois conceitos tempo e percepção. Tem como fundamentação a premissa de que o tempo de resposta do indivíduo a

determinados estímulos é capaz de demonstrar o grau de associação entre os conceitos apresentados (GREENWALD, MCGHEE, *et al.*, 1998).

Teste de Associação Implícita estuda a medida de atitudes implícitas do subconsciente (GREENWALD, MCGHEE, *et al.*, 1998) criada para a presente pesquisa, aplicando-se como categorias de estímulos as palavras Sim e Não, em caixas de texto de cores Verde e Vermelha, respectivamente. Foram realizados por 45 consumidores em duas situações: com 14 imagens, que transmitiam tranquilidade, alegria, tristeza e angústia e com 12 palavras associativas a atributos de qualidade agradáveis e desagradáveis. Foi utilizado ainda o sistema *Open and Online IAT*, traduzido para o português, disponibilizado na Internet por meio da linguagem *Java script* acessível por qualquer computador ou dispositivo com conexão à rede.

Foi realizado um pré-teste de avaliação entre os pesquisadores, validando sua aplicação e, posteriormente, o teste foi aplicado por meio do link <https://nenc.com.br/IAT/game.php?exp=4&cli=1> a ser acessado pela internet, em que se apresentava como um “jogo” cujo objetivo apresentado era o de relacionar a imagem que apareciam, com a informação que acompanha as opções de resposta. Com base nessa comparação o participante deveria escolher uma opção, “sim” ou “não” conforme o que achasse adequado em cada item. Inicialmente foi apresentado um vídeo explicativo, de 2 minutos, sobre o produto e, posteriormente solicitou-se que o participante preenchesse o campo com seu nome para, em seguida iniciar o processo.

## 2.5 Análise estatística

Os resultados foram avaliados estatisticamente através de Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Diferença Mínima Significativa de Fisher – *LSD Test* ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o programa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc.). As contagens bacterianas terão seus valores logaritmizados antes da análise estatística. Em relação a análise sensorial utilizou-se ANOVA e o teste de comparação de médias foi através do teste Benferroni a 5% de probabilidade.

### **3. Resultados e discussão**

Na tabela 1 estão apresentados os resultados das análises físico-químicas realizadas em morangos com e sem cobertura de gelatina, adicionada ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C.

Tabela 1: Análises físico-químicas realizadas em morangos com e sem cobertura de gelatina, adicionada ou não de óleos essenciais de tomilho de laranja doce e, em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C

Tratamento	pH			Acidez (%)			Perda de massa (%)			Sólidos solúveis (°brix)		
	Tempo (min)			Tempo (min)			Tempo (min)			Tempo (min)		
	0	8	15	0	8	15	0	8	15	0	8	15
T1	3,52 aA	3,63 aA	3,8 aA	1,61 aA	3,35 aA	4,91 aA	0aA	1,57aB	5,73aC	4,8 aA	5,4 aA	2,7 ab
T2	3,56 aA	4,33 aA	9,8 aA	2,42 aA	4,32 aA	9,44 cA	0aA	4,35 bB	7,9 bC	5,2 aA	6,7 aA	3,5 ab
T3	3,5 aA	5,4 aA	5,2 aA	6,69 cA	10,12 bA	12,24 cA	0aA	1,87 aB	6,73 aC	5,5 aA	6,4 aA	3,4 ab
T4	3,42 aA	4,25 aA	10,9 aA	4,69 bA	3,05 aA	7,8 bA	0aA	4,07 bB	7,81 bC	5,4 aA	3,5 ab	3,1 ab
T5	3,27 aA	9,0 aA	3,5 aA	6,0 cA	5,41 aA	3,57 aA	0aA	6,71 cB	8,87 cC	6,0 aA	5,3 aA	0,7 ab

\* Médias seguidas por letras distintas apresentam diferença significativa a 5 % de probabilidade.

T1- Morango in natura, T2 – Morango com cobertura de gelatina, T3 – Morango com cobertura de gelatina e óleo essencial de tomilho, T4 – Morango com cobertura e óleo essencial de laranja doce, T5- morango com cobertura e óleo essencial de tomilho e de laranja doce. Tempo 0 – tempo de armazenamento de até um dia de armazenamento, Tempo 8 - tempo de armazenamento de até 8 dias de armazenamento e Tempo 15 - tempo de armazenamento de até 15 dias de armazenamento. Letras minúsculas diferentes entre as linhas e indicam diferenças significativas entre os tratamentos aplicados ( $p < 0,05$ ) e letras maiúsculas diferentes entre colunas indicam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento aplicados ( $p < 0,05$ ).

Em relação aos resultados foi feita uma análise generalista a partir da soma das médias encontradas nos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, não sendo analisadas diferenças pontuais. As coberturas testadas não conseguiram diminuir a perda de massa e todas, com exceção da cobertura com o óleo essencial de tomilho (que se mostrou a mais eficiente com uma perda de 1,87% no tempo 8 e 6,73% no tempo 15) diferiram significativamente ( $p<0,05$ ) do controle. Os morangos são frequentemente afetados por uma perda rápida de peso devido a sua fina pele protetora, essa perda de peso reflete a taxa de respiração e a perda de umidade para o ambiente externo (VELICKOVA, WINKELHAUSEN, *et al.*, 2013), entretanto, as coberturas não foram efetivas para diminuir significativamente esta perda. Beltrão *et al.*, (2017) estudando coberturas a base de fécula de mandioca em morangos, obteve resultados similares a este estudo, dentre as coberturas testadas pelos pesquisadores à base de fécula mostrou-se com uma perda de massa menor, porém, assim como em nosso estudo, o controle teve uma perda menor quando comparado as demais coberturas (BELTRÃO, 2017).

Korte & Favarão (2016), utilizando morangos com revestimento de gelatina com extrato de hortelã e gelatina com extrato de cravo da índia também obtiveram resultados negativos, com perda significativa de massa e diminuição na vida útil do fruto (KORTE, FAVARÃO, 2016). Coberturas a base de fruta-de-lobo e sorbitol também não foram eficientes na conservação e na diminuição da perda de massa de morangos (PRATES, ASCHERI, 2011). Todos estes trabalhos demonstram que as coberturas em muitos casos não conseguem atuar para diminuição da perda de massa, não sendo um resultado específico do nosso estudo.

Verificou-se que houveram diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre os valores de acidez em relação aos tratamentos aplicados e aos tempos de armazenamento, ou seja, os tratamentos aplicados e o tempo de armazenamento influenciaram significativamente nos valores de acidez. Em relação aos tratamentos, morangos com cobertura de gelatina e com cobertura de gelatina e óleo essencial de tomilho apresentaram o valor de acidez significativamente superior ( $p<0,05$ ) aos demais tratamentos. E em relação ao

tempo de armazenamento, houveram diferenças significativas entre os valores de acidez do primeiro dia (T0) e os encontrados do décimo quinto dia (T15), estes últimos foram significativamente maiores ( $p<0,05$ ). Perdones et al. (2012), utilizando tratamento com e sem revestimentos de quitosana e óleo essencial de limão em morangos, obteve um aumento no valor de pH e acidez titulável com o tempo de armazenamento a 4 °C. Isso mostra o possível efeito dos óleos essenciais na atividade metabólica e nas membranas celulares do fruto (PERDONES, SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, et al., 2012).

Na determinação do pH verificou-se que não houveram diferenças significativas ( $p>0,05$ ) entre os valores de pH em relação aos tratamentos aplicados e aos tempos de armazenamento, ou seja, os tratamentos aplicados não influenciaram significativamente nos valores de pH, e os tempos de armazenamento também não influenciaram.

Verificou-se que não houveram diferenças significativas ( $p>0,05$ ) entre os valores de Sólidos Solúveis em relação aos tratamentos aplicados, porém, houveram diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre os valores de Sólidos Solúveis em relação aos tempos de armazenamento, ou seja, os tratamentos aplicados não influenciaram nos valores de sólidos solúveis, mas os tempos de armazenamento influenciaram significativamente nos valores de Sólidos Solúveis. Em relação ao tempo de armazenamento, no tempo 15 dias (T15) foram encontrados valores de sólidos solúveis significativamente inferiores ( $p<0,05$ ) aos valores de sólidos solúveis do primeiro dia (T0) e do oitavo dia (T8).

Uma possível explicação para isso pode estar relacionada ao estado de maturação e a degradação de polissacarídeos, que influencia diretamente ao teor de sólidos solúveis (CHITARRA, CHITARRA, 1990). Assim como foi verificado em nosso estudo, Scartazzini (2018), em um estudo da atividade antifúngica do óleo essencial de menta incorporado em coberturas comestíveis à base de gelatina para aplicação em morango. Os autores verificaram uma redução significativa nos sólidos solúveis ( $p < 0,05$ ) com o tempo de armazenamento em todos os tratamentos testados, sendo justificado pela hidrólise da sacarose para manter a atividade fisiológica do fruto (SCARTAZZINI, 2018). DA e Haertel (2014) estudando compostos bioativos e características físico-químicas de morangos cv. Camarosa minimamente processados submetidos a revestimentos à base de gelatina, goma xantana e óleo de canola,

observou também resultados inferiores ao final do experimento, quando comparados ao controle, e atribuiu essa diferença a variação dos frutos, quanto ao seu tempo de colheita e maturação (DA, HAERTEL, 2014).

Suzin (2018), estudando a influência de cobertura comestível a base de pectina com ácido cinâmico na vida útil de morango refrigerado, obteve resultados similares. Nos primeiros dias de armazenamento não houve diferença significativa, já no oitavo dia obteve uma diminuição dos sólidos solúveis.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no anexo 1 da Instrução Normativa N° 60, de 23 de dezembro de 2019 (BRASIL, 2019) é estabelecido que frutas "*In natura*", inteiras, selecionadas ou não, devem apresentar ausência de *Salmonella* spp. em 25g e no máximo 10<sup>3</sup> para *Escherichia coli*.

Na tabela 2 estão apresentados os resultados das enumerações de coliformes termotolerantes realizadas em morangos com e sem cobertura de gelatina, adicionada ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C.

Tabela 2: Médias das enumerações de coliforme termotolerantes em morangos com e sem cobertura de gelatina, adicionada ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em triplicata e em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C.

<b>Tratamento</b>	<b>Coliformes Termotolerantes (NMP. g<sup>-1</sup>)</b>		
	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3
T1	<3 NMP/g <sup>aA</sup>	<3 NMP/g <sup>aA</sup>	<3 NMP/g <sup>aA</sup>
T2	<3 NMP/g <sup>aA</sup>	<3 NMP/g <sup>aA</sup>	<3 NMP/g <sup>aA</sup>
T3	<3 NMP/g <sup>aA</sup>	<3 NMP/g <sup>aA</sup>	<3 NMP/g <sup>aA</sup>
T4	<3 NMP/g <sup>aA</sup>	<3 NMP/g <sup>aA</sup>	<3 NMP/g <sup>aA</sup>
T5	<3 NMP/g <sup>aA</sup>	<3 NMP/g <sup>aA</sup>	<3 NMP/g <sup>aA</sup>

T1- Morango in natura, T2 – Morango com cobertura de gelatina, T3 – Morango com cobertura de gelatina e óleo essencial de tomilho, T4 – Morango com cobertura e óleo essencial de laranja doce, T5- morango com cobertura e óleo essencial de tomilho e de laranja doce. Tempo 1 - até um dia de armazenamento, Tempo 2 até 7 dias de armazenamento e Tempo 3 até 15 dias de armazenamento. Letras minúsculas diferentes entre as linhas e indicam diferenças significativas entre os tratamentos aplicados ( $p < 0,05$ ) e letras maiúsculas diferentes entre colunas indicam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento aplicados ( $p < 0,05$ ).

Não houveram coliformes termotolerantes nas amostras, por isso, não houveram diferenças nem em relação aos tratamentos e nem em relação aos tempos de armazenamento. Essa ausência de coliformes nas amostras de morango, considerando que os frutos foram adquiridos em estabelecimentos comerciais, pode ser atribuída as boas práticas de higiene aplicadas na produção primária e secundária, começando na manipulação dos frutos na sua origem até chegar ao consumidor final, é possível também que os morangos tenham passado por algum processo de desinfecção com hipoclorito de sódio, por exemplo (TAVARES, 2015).

Os resultados das enumerações de microrganismos mesófilos aeróbios realizadas em morangos com e sem cobertura de gelatina, adicionada ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C (Tabela 3).

Tabela 3: Médias das enumerações de microrganismos mesófilos aeróbios em morangos com e sem cobertura de gelatina, adicionada ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em triplicata e em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C.

<b>Tratamento</b>	<b>Microrganismos Mesófilos Aeróbios (UFC. g<sup>-1</sup>)</b>		
	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3
T1	1,7x10 <sup>3aA</sup>	5,3x10 <sup>5 bA</sup>	1,5x10 <sup>4 bA</sup>
T2	0 <sup>aA</sup>	3,0x10 <sup>4 bA</sup>	1,5x10 <sup>5 bA</sup>
T3	0 <sup>aA</sup>	1,9x10 <sup>4 bA</sup>	3,2x10 <sup>6 bA</sup>
T4	1,0x10 <sup>3 aA</sup>	1,2x10 <sup>5 bA</sup>	1,1x10 <sup>6 bA</sup>
T5	0 <sup>aA</sup>	1,2x10 <sup>2 bA</sup>	1,6x10 <sup>5 bA</sup>

T1- Morango in natura, T2 – Morango com cobertura de gelatina, T3 – Morango com cobertura de gelatina e óleo essencial de tomilho, T4 – Morango com cobertura e óleo essencial de laranja doce, T5- morango com cobertura e óleo essencial de tomilho e de laranja doce. Tempo 1 - até um dia de armazenamento, Tempo 2 -até 7 dias de armazenamento e Tempo 3 até 15 dias de armazenamento. Letras minúsculas diferentes entre as linhas e indicam diferenças significativas entre os tratamentos aplicados ( $p < 0,05$ ) e letras maiúsculas diferentes entre colunas indicam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento aplicados ( $p < 0,05$ ).

Em relação a quantificação de microrganismos mesófilos aeróbios não foi verificada diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os valores das enumerações destes microrganismos em relação aos tratamentos aplicados. Contudo houveram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nas contagens de mesófilos

aeróbios em relação aos tempos de armazenamento, ou seja, os tempos de armazenamento influenciaram significativamente nos valores das contagens de microrganismos mesófilos aeróbios. Em relação ao tempo de armazenamento, no tempo de até um dia (T0) foram encontrados os menores valores de contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, sendo significativamente inferiores ( $p<0,05$ ) aos valores de microrganismos mesófilos aeróbios dos tempos 8 e 15 dias. O tempo de 8 dias (T8) não diferiu do tempo de quinze dias (T15) em relação a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios.

Diferentemente dos coliformes houve o desenvolvimento de mesófilos. Isto pode ser atribuído ao fato que os microrganismos mesófilos aeróbios compreendem um grupo muito diverso, onde um microrganismo pode ter encontrado condições favoráveis e se desenvolvido e ter influenciado nas contagens. Cabe destacar que contagens consideradas como significativas para deterioração de frutas estão na faixa de  $10^5$  ou  $10^6$  e isto foi atingido somente no tempo de armazenamento igual a quinze dias nos morangos que receberam coberturas, diferentemente dos morangos sem cobertura que atingiram valores de  $10^5$  no tempo de armazenamento igual a oito dias. Diferentemente deste resultado, Barreiro (2016) estudando utilização de cobertura comestível a base de pectina de baixa metoxilação e ácido cinâmico em morango refrigerado, quando analisado a contagem de mesófilos obteve o menor desenvolvimento de micro-organismos no grupo controle sem cobertura ao final do período de armazenamento (BARREIRO, 2016). De qualquer forma este resultado demonstra que o poder inibitório das coberturas não é tão amplo, mesmo nas adicionadas de óleo essencial, ou seja, sendo fundamental a utilização conjunta de boas práticas na manipulação dos frutos, antes do processo da aplicação da cobertura e também após a aplicação.

Na tabela 4 estão apresentados os resultados das contagens de fungos realizadas em morangos com e sem cobertura de gelatina, adicionada ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C.

Tabela 4: Médias das contagens de fungos em morangos com e sem cobertura de gelatina, adicionada ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em triplicata e em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C

Tratamento	Fungos (UFC. g <sup>-1</sup> )	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3
T1		$6,9 \times 10^3$ aA	$1,3 \times 10^6$ aB	$>10^6$ (est) aC
T2		$1,0 \times 10^2$ bA	$1,5 \times 10^3$ bB	$9,4 \times 10^5$ bC
T3		$1,6 \times 10^2$ bA	$1,7 \times 10^6$ aB	$>10^6$ (est) aC
T4		$1,2 \times 10^3$ aA	$2,4 \times 10^4$ bB	$1,2 \times 10^6$ aC
T5		0 cA	$1,6 \times 10^2$ cB	$7,0 \times 10^2$ cC

T1- Morango in natura, T2 – Morango com cobertura de gelatina, T3 – Morango com cobertura de gelatina e óleo essencial de tomilho, T4 – Morango com cobertura e óleo essencial de laranja doce, T5- morango com cobertura e óleo essencial de tomilho e de laranja doce. Tempo 1 - até um dia de armazenamento, Tempo 2 -até 7 dias de armazenamento e Tempo 3 até 15 dias de armazenamento. est – Contagem estimativa. Letras minúsculas diferentes entre as linhas e indicam diferenças significativas entre os tratamentos aplicados ( $p < 0,05$ ) e letras maiúsculas diferentes entre colunas indicam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento aplicados ( $p < 0,05$ ).

No caso dos fungos verificou-se que houveram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os valores das enumerações de fungos em relação aos tratamentos aplicados e aos tempos de armazenamento, ou seja, os tratamentos aplicados e o tempo de armazenamento influenciaram significativamente nos valores das contagens de fungos. Em relação ao tempo de armazenamento no tempo de até um dia (T0) foram encontrados os menores valores de contagem de fungos, sendo significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) aos valores de fungos dos tempos de 08 e de 15 dias, e no tempo de até 08 dias (T8) foram encontrados valores de contagem de fungos significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) aos valores de fungos do tempo de 15 dias (T15).

Em relação aos tratamentos, dois tratamentos apresentaram os melhores valores, os morangos com cobertura de gelatina e os morangos com cobertura de gelatina e óleo de laranja doce e óleo de tomilho apresentaram os menores valores de enumeração de fungos, sendo significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) aos demais tratamentos.

Essa diminuição no crescimento fúngico nos tratamentos com cobertura e com óleos essenciais pode ser explicada pela redução do teor de umidade do fruto, pelas condições anaeróbicas formada pela película dos tratamentos, considerando que fungos são estritamente aeróbios e também pela ação antifúngica dos óleos essenciais. Em concordância com os nossos resultados,

Mendonça (2016) em um estudo similar com coberturas comestíveis, relatou que morangos recobertos com filmes a base de monascus e sorbato de potássio mostraram uma ação antimicrobiana eficiente, a mesma autora relata que após o 15º dia de armazenamento obtiveram uma redução no crescimento microbiano para a maioria das amostras, o autor justifica a redução do teor de umidade dos frutos e pela anaerobiose formada pela película sobre o fruto (MENDONÇA, 2016). Scartazzini (2018) no estudo da atividade antifúngica do óleo essencial de menta incorporado em coberturas comestíveis à base de gelatina para aplicação em morango também verificou uma redução significativa de desenvolvimento fúngico devido aos tratamentos aplicados (SCARTAZZINI, 2018).

Os resultados das contagens de microrganismos psicrotróficos aeróbios realizadas em morangos com e sem cobertura de gelatina, adicionada ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Médias das contagens de microrganismos psicrotróficos aeróbios em morangos com e sem cobertura de gelatina, adicionada ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em triplicata e em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C.

<b>Tratamento</b>	<b>Microrganismos Psicrotróficos Aeróbios (UFC. g<sup>-1</sup>)</b>		
	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3
T1	9,8x10 <sup>8</sup> aA	3,3x10 <sup>6</sup> aB	3,0X10 <sup>6</sup> aB
T2	1,0x10 <sup>2</sup> bA	1,9x10 <sup>4</sup> bC	9,1X10 <sup>5</sup> bD
T3	1,6x10 <sup>2</sup> bA	3,0x10 <sup>5</sup> aC	4,1X10 <sup>5</sup> bD
T4	9,7x10 <sup>8</sup> aA	2,3x10 <sup>5</sup> aC	1,5x10 <sup>6</sup> aD
T5	0 cA	6,8x10 <sup>4</sup> bC	3,3x10 <sup>5</sup> bD

T1- Morango in natura, T2 – Morango com cobertura de gelatina, T3 – Morango com cobertura de gelatina e óleo essencial de tomilho, T4 – Morango com cobertura e óleo essencial de laranja doce, T5- morango com cobertura e óleo essencial de tomilho e de laranja doce. Tempo 1 - até um dia de armazenamento, Tempo 2 -até 7 dias de armazenamento e Tempo 3 até 15 dias de armazenamento. Letras minúsculas diferentes entre as linhas e indicam diferenças significativas entre os tratamentos aplicados ( $p < 0,05$ ) e letras maiúsculas diferentes entre colunas indicam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento aplicados ( $p < 0,05$ ).

Houveram diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre os valores das enumerações de microrganismos psicrotróficos em relação aos tratamentos aplicados e aos tempos de armazenamento, ou seja, os tratamentos aplicados e o tempo de armazenamento influenciaram significativamente nos valores das contagens de microrganismos psicrotróficos. Em relação aos tratamentos, morangos com cobertura de gelatina e óleo de laranja doce e óleo de tomilho apresentaram os menores valores de enumeração de microrganismos psicrotróficos, sendo significativamente inferior ( $p<0,05$ ) aos demais tratamentos. A atuação conjunta da cobertura com os dois óleos essenciais mostrou-se mais eficiente do que somente a cobertura de gelatina ou a cobertura e um dos óleos essenciais. Rocha (2011) estudando o uso de revestimentos comestíveis na preservação da qualidade de carambola (*Averrhoa carambola* L.) minimamente processada, encontrou resultados similares, quando realizado a contagem padrão de aeróbios psicrotróficos, verificou valores inferiores nos tratamentos com quitosana e alginato de sódio, mostrando assim a eficiência das coberturas bioativas (MARTINS ROCHA, MURILLO, et al., 2010).

E em relação ao tempo de armazenamento, no tempo de até um dia (T0), foram encontrados os menores valores de contagem de microrganismos psicrotróficos, sendo significativamente inferiores ( $p<0,05$ ) aos valores de microrganismos psicrotróficos dos tempos de 08 e de 15 dias, e no tempo de até 08 dias (T8) foram encontrados valores de contagem de microrganismos psicrotróficos significativamente inferiores ( $p<0,05$ ) aos valores de microrganismos psicrotróficos do tempo de 15 dias (T15). Isto provavelmente aconteceu devido aos psicrotróficos se adaptarem e se desenvolverem melhor em temperaturas de refrigeração que outros microrganismos. Considerando os resultados encontrados e a amplitude dos microrganismos psicrotróficos, onde a maioria das espécies deste grupo são de origem ambiental, mais uma vez se destaca a necessidade de boas práticas na produção e comercialização destes frutos, mesmo que estes recebam coberturas bioativas.

Mendonça (2016), encontrou resultados similares com uma diminuição na contagem de psicotrópicos, devido ao baixo teor de água e ação antimicrobiana das coberturas Garcia (2009) estudando a aplicação de coberturas comestíveis em morangos minimamente processados, encontrou uma variação na contagem de microrganismos psicrotróficos, apresentando uma contagem de psicotrópicos

bem inferior no tempo 15 dias quando comparadas aos demais tempos de contagem, mostrando que é possível armazenar morangos a 5°C por 15 (GARCIA, 2009). Essas inúmeras variações podem também ser influenciadas por outros fatores, considerando que cada pseudofruto possui um metabolismo e uma carga microbiana inicial diferente, levando em consideração que o morango em muitas situações está diretamente em contato com a terra, deixando o suscetível a uma maior carga microbiana.

### ***Salmonella* spp.**

Na tabela 6 estão apresentados os resultados da pesquisa de *Salmonella* spp. realizadas em morangos com e sem cobertura de gelatina, adicionada ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho.

**Tabela 6** *Salmonella* spp. em morangos com e sem cobertura de gelatina adicionada de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em triplicata sob temperatura de 7°C.

<b>Tratamento</b> <i>Salmonella</i> spp. em 25 g	
(Presença/Ausência)	
M1	Ausência
M2	Ausência
M3	Presença
M4	Presença
M5	Ausência

M1 – Morango controle; M2 – Morango somente com cobertura de gelatina; M3 – Morango sem cobertura e contaminado com *Salmonella* spp; M4 – Morango contaminado com *Salmonella* spp e depois imerso na cobertura de gelatina; M5 – Morango com cobertura de gelatina e depois contaminado de *Salmonella* spp.

Conforme demonstrado na Tabela 6, a imersão em cobertura de gelatina com óleo essencial de laranja doce e tomilho feita posteriormente à contaminação dos frutos pelo agente não teve ação contra o microrganismo, sendo este detectado em análise efetuada após o tratamento. Em contrapartida, a cobertura de gelatina aplicada a previamente à contaminação apresentou ação

antimicrobiana, tendo em vista a ausência de *Salmonella spp* na amostra analisada.

Segundo a Instrução Normativa N° 60, de 23 de dezembro de 2019 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2019), os Padrões Microbiológicos para morangos e produtos frescos similares, in natura, selecionados aleatoriamente, tem tolerância e ausência para *Salmonella spp./25g*. Mendonça (2016) Estudando avaliação da qualidade de morangos recobertos com diferentes filmes biodegradáveis durante sua “shelf-life”, encontrou ausência de *Salmonella spp*, em todos os tratamentos inclusive o tratamento controle.

Bulow et al (2017) realizando uma avaliação higiênico-sanitária em amostras indicativas de qualidade de morangos comercializados em três cidades do meio oeste catarinense, encontrou ausência de *Salmonella spp.* em todas as amostras testadas, porém apresentaram coliformes totais e termotolerantes em concentrações iguais ou abaixo de 3,0 NMP/g, estando assim abaixo do valor mínimo.

### **Análise sensorial**

As coberturas a base de gelatina se mostraram com uma boa aderência quando aplicadas aos frutos, intensificando o brilho e a aparência dos morangos, tornando-os mais atraentes para a sua comercialização.

Na tabela 7 estão apresentados o percentual das respostas “não e sim” e o tempo em segundos de resposta, para amostra de morangos com cobertura de gelatina. O tempo total do teste para todos os consumidores foi entre 5 a 8 minutos.

Tabela 7: Resultados de “não e sim” e tempo de resposta no Teste de Associações Implícitas (TAI) em morangos com cobertura de gelatina (n=45)

Imagens	Não (%)	Tempo/resposta (s)	Sim (%)	Tempo/resposta (s)
Academia	54,2	,1,782	45,8	45992
Acidente	75,5	,11,641	24,5	11,933
Aeroporto	53,7	33,679	46,3	2,680
Chuva	63,3	13,588	36,7	7,73
Dinheiro	37,5	12,045	62,5	23,418
Escola	55,9	7,242	44,1	12,954
Esporte	59,0	2,157	41,0	5,293
Festa	49,0	3,308	51,0	7,234
Flores	50,0	1,9745	50,0	18,701
Neve	51,4	1,4825	48,6	5,199
Parque	32,4	1,4892	67,6	20,343
Praça	40,9	1,8470	59,1	10,007
Praia	47,9	1,0403	52,1	43,883
Shopping	65,7	6,0844	34,3	34,878
<b>Palavras associativas</b>				
Alimento contaminado	58,7	3,054	41,3	12,227
Aspecto desagradável	51,6	23,062	48,4	2,909
Atrativo e apetitoso	47,2	25,241	52,8	13,920
Aumento de vida útil	35,7	7,103	64,3	9,352
Evitar consumo de bactérias	42,9	17,438	57,1	9,331
Impróprio para o consumo	36,6	6,643	63,4	7,476
Intoxicação alimentar	56,8	19,061	43,2	29,417
Não conserva	60,5	8,297	39,5	11,557
Preservação de qualidade	55,8	15,009	44,2	8,88
Saudável	56,8	4,410	43,2	6,939
Sem qualidade	58,1	37,420	41,9	24,174

Ao analisar as informações coletadas podemos perceber que a maior incidência de “sim” ficou nas imagens dinheiro, festa, parque, praça e praia, já quando analisado as palavras associativas pode-se perceber que as palavras associativas “aumento da vida útil, atrativo e apetitoso” tiveram uma maior aceitação. Em contra partida as palavras “impróprio para o consumo e evitar consumo de bactérias” teve uma grande participação. Deixando claro a necessidade de buscar novas técnicas de conservação eficazes e atraentes ao consumo.

Observando as palavras associativas, quando os consumidores visualizaram a imagem de morango com coberturas comestíveis de gelatina para 'alimento contaminado (58,7), aspecto desagradável (51,6), intoxicação alimentar (56,8), não conserva (60,5)', foram os estímulos que apresentaram os maiores percentuais para 'não', e foram os que apresentaram o menor tempo de resposta. Este fato, colabora para afirmar que os morangos não remetem a estas impressões negativas. No entanto, o maior percentual para 'não' à associação para 'preservação de qualidade e sem qualidade' leva o consumidor a ter dúvidas em sua resposta, devido ao maior tempo em responder. Levando assim a necessidade de trabalhar práticas visando não só a qualidade do tratamento, mas também a sua aparição.

#### **4. Conclusões**

As coberturas não foram eficientes na diminuição de perda de massa, com exceção da cobertura com óleo essencial de laranja doce que se mostrou a mais eficiente, quando comparada ao controle.

O tempo de armazenamento combinados com a aplicação das coberturas não influenciou nos valores de pH dos frutos. Já em relação aos sólidos solúveis, estes foram afetados levando a valores mais baixos conforme o maior tempo de armazenamento.

Já na contagem de mesofílos aeróbios o tempo de armazenamento, influenciou nos valores encontrados. Os menores valores de contagem foram no tempo 0 mostrando que o tempo armazenado mesmo a baixas temperaturas favoreceu o seu desenvolvimento. Em relação ao crescimento fúngico, dois tratamentos foram mais eficientes na inibição (morangos com cobertura de gelatina e morangos com cobertura de gelatina, óleo de laranja doce e óleo de tomilho), indicando que a ação conjunta da cobertura com estes óleos essenciais é uma alternativa promissora para evitar a proliferação destes microrganismos em morangos.

Já a análise sensorial mostrou boa aceitação dos participantes ao produto.

Quando analisado a presença de *Salmonella*, verificou-se que a imersão em cobertura de gelatina com óleo essencial de laranja doce e tomilho feita previamente à contaminação dos frutos apresentou efeito inibitório deste microrganismo.

## 5. Referências

- BARREIRO, E. **Utilização de revestimento de cobertura comestível a base de pectina de baixa metoxilação e ácido cinâmico em morango refrigerado.** [S.I.], Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 8 jun. 2016. Disponível em: <http://repositorio.roca.utfpr.edu.br:8080/jspui/handle/1/14748>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- BELTRÃO, F. **Desenvolvimento e avaliação de revestimento comestível com adição de antifúngicos naturais para a proteção de morangos.** 2017. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2017. Disponível em: <http://repositorio.roca.utfpr.edu.br:8080/jspui/handle/1/11400>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- CALO, J. R., CRANDALL, P. G., O'BRYAN, C. A., et al. **Essential oils as antimicrobials in food systems - A review.** *Food Control*. [S.I: s.n.], 2015
- CHITARRA, M. I. F., CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças - fisiologia e manuseio.** [S.I: s.n.], 1990.
- DA, A. O., HAERTEL, S. **Compostos bioativos e características físico-químicas de morangos cv. Camarosa minimamente processados submetidos a revestimentos à base de gelatina, xantana e óleo de canola.** 2014. Universidade Federal de Pelotas, 2014. Disponível em: <http://repositorio.ufpel.edu.br:8080/handle/ri/2707>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- DE OLIVEIRA, C. M., SILVA, O. F., DA SILVA, M. C., et al. "Utilização Do Soro De Leite Bovino Como Revestimento Protetor Em Morangos", **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 2, 2008. DOI: 10.5380/cep.v26i2.13273. .
- EMBRAPA. **A CULTURA DO MORANGO 2 a edição revista e ampliada.** [S.I: s.n.], 2011.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia Segurança Alimentos dos da.** [S.I: s.n.], 2012.
- GARCIA, L. C. **Aplicação De Coberturas Comestíveis Em Morangos Minimamente Processados.** 2009. 2009.

GREENWALD, A. G., MCGHEE, D. E., SCHWARTZ, J. L. K. "Measuring individual differences in implicit cognition: The implicit association test", **Journal of Personality and Social Psychology**, v. 74, n. 6, p. 1464–1480, 1998. DOI: 10.1037/0022-3514.74.6.1464. .

KORTE, K. P., FAVARÃO, S. C. M. "Efeito da gelatina incolor e comercial associada a extratos vegetais como revestimento comestível na pós-colheita do morango", **Campo Digital**, v. 11, n. 1, p. 08–15, 2016. .

MAFTOONAZAD, N., RAMASWAMY, H. S., MOALEMIYAN, M., *et al.* "Effect of pectin-based edible emulsion coating on changes in quality of avocado exposed to *Lasiodiplodia theobromae* infection", **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 2, p. 341–349, 2007. DOI: 10.1016/j.carbpol.2006.11.020. .

MARTINS, G. D. S. O., ZAGO, H. B., COSTA, A. V., *et al.* "Chemical composition and toxicity of citrus essential oils on *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae)", **Revista Caatinga**, v. 30, n. 3, p. 811–817, 2017. DOI: 10.1590/1983-21252017v30n330rc. .

MARTINS ROCHA, T., MURILLO, ;, JÚNIOR, F., *et al.* "Uso de Revestimentos Comestíveis na Preservação da Qualidade de Carambola (*Averrhoa carambola* L.) Minimamente Processada", 2010. .

**MENDONÇA, J. N. DE. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE MORANGOS RECOBERTOS COM DIFERENTES FILMES BIODEGRADÁVEIS DURANTE SUA SHELF-LIFE".** 2016. 2016.

PERDONES, A., SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L., CHIRALT, A., *et al.* "Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry", **Postharvest Biology and Technology**, v. 70, p. 32–41, 2012. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2012.04.002. .

PRATES, M. F. O., ASCHERI, D. P. R. "Efeito da cobertura de amido de fruta-de-lobo e sorbitol e do tempo de armazenamento na conservação pós-colheita de frutos de morango", **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 21–32, 2011. DOI: 10.5380/cep.v29i1.22746. .

SCARTAZZINI, L. **Estudo da atividade antifúngica do óleo essencial de menta incorporado em coberturas comestíveis à base de gelatina para**

aplicação em morango (*Fragaria x ananassa*). 2018. 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/198790>. Acesso em: 15 mar. 2021.

TAVARES, T. S. **Revestimento de quitosana na manutenção da qualidade pós-colheita de morangos**. 2015. UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 2015. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/5575>. Acesso em: 15 mar. 2021.

VELICKOVA, E., WINKELHAUSEN, E., KUZMANOVA, S., *et al.* "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, n. 2, p. 80–92, 2013. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.02.004. .

WATTANASATCHA, A., RENGPIPAT, S., WANICHWECHARUNGRUANG, S. "Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent", **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, n. 1–2, p. 360–365, 2012. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.06.017.

## 11 Considerações finais

O morango apresenta-se como um fruto sensível durante e após seu plantio, se beneficiando de tecnologias de proteção como as coberturas comestíveis. A partir dos estudos realizados com as coberturas a base de gelatina combinadas com óleos essências, estas mostraram-se eficientes em diversos aspectos do produto, como seu aumento de vida nas prateleiras, melhores condições quando submetidos a diferentes temperaturas e a diminuição da carga microbiológica, que é uma das áreas que mais afeta os morangos devido a alta taxa de sensibilidade a bactérias e fungos, as coberturas propiciaram melhorias não só em aspectos físicos químicos, mas também na aparência do fruto, apresentando-se como uma alternativa mais viável e saudável de conservação.

A partir da análise sensorial, derivou-se a necessidade de ajustar as coberturas desenvolvidas para a promoção de aspectos visuais e sensoriais melhores, deixando esta lacuna para que novos estudos, posteriores a pandemia, que possam ser presenciais e que possam aprofundar-se neste aspecto a partir de novas combinações, ou até mesmo usar desta para embasar outras, fazendo indispensável a busca de novas alternativas de conservação e de técnicas com tecnologias sustentáveis.

## Referências bibliográficas

- ALVES, A. I., SARAIVA, S. H., LUCIA, S. M. D., *et al.* "Qualidade De Morangos Envolvidos Com Revestimento Comestível Antimicrobiano À Base De Diferentes Fontes De Amido", **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, p. 1519–1526, 2011..
- ASSIS, O. B. G., BRITTO, D. de. "Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações", **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 2, p. 87–97, jun. 2014. DOI: 10.1590/bjft.2014.019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/bjft.2014.019>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- BARA, M. **Avaliação do efeito inibidor de condimentos no desenvolvimento de Yersinia enterocolitica.** 1992. 1992. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000051&pid=S1413-7054200400030002700002&lng=en](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000051&pid=S1413-7054200400030002700002&lng=en). Acesso em: 15 mar. 2021.
- BARREIRO, E. **Utilização de revestimento de cobertura comestível a base de pectina de baixa metoxilação e ácido cinâmico em morango refrigerado.** . [S.I.], Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 8 jun. 2016. Disponível em: <http://repositorio.roca.utfpr.edu.br:8080/jspui/handle/1/14748>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- BASTIANEL, M., DE OLIVEIRA, A. C., CRISTOFANI, M., *et al.* "Genetic diversity among hybrids of sweet orange and "Murcott" tangor evaluated by fAFLP and RAPD markers", **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 779–784, 2006. DOI: 10.1590/s0100-204x2006000500009. .
- BELTRÃO, F. **Desenvolvimento e avaliação de revestimento comestível com adição de antifúngicos naturais para a proteção de morangos.** 2017. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2017. Disponível em: <http://repositorio.roca.utfpr.edu.br:8080/jspui/handle/1/11400>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- BIZZO, H. R., ANA MARIA, C. H., REZENDE, C. M. "Oleos essenciais no brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas", **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, 2009. DOI: 10.1590/S0100-40422009000300005. .
- BORGES, C. D., MENDONÇA, C. R. B., ZAMBIAZI, R. C., *et al.* "Conservação de morangos com revestimentos à base de goma xantana e óleo essencial de sálvia", **Bioscience Journal**, v. 29, n. 5, p. 1071–1083, 2013. .
- CALO, J. R., CRANDALL, P. G., O'BRYAN, C. A., *et al.* **Essential oils as**

- antimicrobials in food systems - A review.** *Food Control*. [S.l: s.n.], 2015
- CHITARRA, M. I. F., CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças - fisiologia e manuseio.** [S.l: s.n.], 1990.
- CDC. [Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019](#). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019.
- COSTA, C. S. da. **Prolongamento da vida útil e qualidade pós-colheita de morangos pelo emprego de cobertura comestível.** . [S.l: s.n.], 2009.
- CRISTINA BENINCÁ, M. **Efeito Inibitório De Óleos Essenciais Contra *Staphylococcus Aureus* Multirresistentes e Formadores De Biofilmes.** 2018. Universidade de Passo Fundo, 2018. Disponível em: <http://tede.upf.br/jspui//handle/tede/1654>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- DA, A. O., HAERTEL, S. **Compostos bioativos e características físico-químicas de morangos cv. Camarosa minimamente processados submetidos a revestimentos à base de gelatina, xantana e óleo de canola.** 2014. Universidade Federal de Pelotas, 2014. Disponível em: <http://repositorio.ufpel.edu.br:8080/handle/ri/2707>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- DE OLIVEIRA, C. M., SILVA, O. F., DA SILVA, M. C., et al. "Utilização Do Soro De Leite Bovino Como Revestimento Protetor Em Morangos", **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 2, 2008. DOI: 10.5380/cep.v26i2.13273. .
- EMBRAPA. **A CULTURA DO MORANGO 2 a edição revista e ampliada.** [S.l: s.n.], 2011.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia Segurança Alimentos dos da.** [S.l: s.n.], 2012.
- GARCIA, L. C. **Aplicação De Coberturas Comestíveis Em Morangos Minimamente Processados.** 2009. 2009.
- GREENWALD, A. G., MCGHEE, D. E., SCHWARTZ, J. L. K. "Measuring individual differences in implicit cognition: The implicit association test", **Journal of Personality and Social Psychology**, v. 74, n. 6, p. 1464–1480, 1998. DOI: 10.1037/0022-3514.74.6.1464. .
- GRIMONT, P., WEILL, F.-X. "Antigenic formulae of the *Salmonella* servovars: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*", **9th Edition, Institute Pasteur**, 2007. .
- KORTE, K. P., FAVARÃO, S. C. M. "Efeito da gelatina incolor e comercial

- associada a extratos vegetais como revestimento comestível na pós-colheita do morango", **Campo Digital**, v. 11, n. 1, p. 08–15, 2016. .
- MAFTOONAZAD, N., RAMASWAMY, H. S., MOALEMIYAN, M., *et al.* "Effect of pectin-based edible emulsion coating on changes in quality of avocado exposed to *Lasiodiplodia theobromae* infection", **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 2, p. 341–349, 2007. DOI: 10.1016/j.carbpol.2006.11.020. .
- MAJOWICZ, S. E., MUSTO, J., SCALLAN, E., *et al.* "The global burden of nontyphoidal salmonella gastroenteritis", **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 6, p. 882–889, 2010. DOI: 10.1086/650733. .
- MARTINS, G. D. S. O., ZAGO, H. B., COSTA, A. V., *et al.* "Chemical composition and toxicity of citrus essential oils on *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae)", **Revista Caatinga**, v. 30, n. 3, p. 811–817, 2017. DOI: 10.1590/1983-21252017v30n330rc. .
- MARTINS ROCHA, T., MURILLO, ;, JÚNIOR, F., *et al.* "Uso de Revestimentos Comestíveis na Preservação da Qualidade de Carambola (*Averrhoa carambola* L.) Minimamente Processada", 2010. .
- MENDONÇA, J. N. DE. **AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE MORANGOS RECOBERTOS COM DIFERENTES FILMES BIODEGRADÁVEIS DURANTE SUA SHELF-LIFE**". 2016. 2016.
- MEWES, S., KRÜGER, H., PANK, F. "Physiological, morphological, chemical and genomic diversities of different origins of thyme (*Thymus vulgaris* L.)", **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 55, n. 8, p. 1303–1311, 2008. DOI: 10.1007/s10722-008-9329-7. .
- MONTES, S. de S., NETA, L. G. S., CRUZ, R. S. "Óleos essenciais em embalagens para alimentos - Revisão de literatura de 2000 a 2012. | Montes | Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia - ISSN: 1984-5693", **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, 2013. Disponível em: <https://revistascientificas.ifrj.edu.br/revista/index.php/revistapct/article/view/368>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- PERDONES, A., SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L., CHIRALT, A., *et al.* "Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry", **Postharvest Biology and Technology**, v. 70, p. 32–41, 2012. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2012.04.002. .
- PERSICO, P., AMBROGI, V., CARFAGNA, C., *et al.* "Nanocomposite polymer

- films containing carvacrol for antimicrobial active packaging", **Polymer Engineering and Science**, v. 49, n. 7, p. 1447–1455, 2009. DOI: 10.1002/pen.21191..
- PRATES, M. F. O., ASCHERI, D. P. R. "Efeito da cobertura de amido de fruta-de-lobo e sorbitol e do tempo de armazenamento na conservação pós-colheita de frutos de morango", **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 21–32, 2011. DOI: 10.5380/cep.v29i1.22746. .
- RICARDO, L. P., MORAIS, M. M., ROSA, G. S. DA. "Estudo De Filmes Biodegradáveis De Recobrimento Aplicado Em Morangos". 2015. **Anais** [...] [S.I: s.n.], 2015. p. 5459–5466. DOI: 10.5151/chemeng-cobeq2014-0597-24776-162407.
- ROGERS, M. D. H. **Rheological properties of gelatin/starch composite gels**. 2001. 2001.
- SARTO, M. P. M., ZANUSSO JUNIOR, G. "ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS", **Revista UNINGÁ Review**, 2014. Disponível em: <http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1559/1170>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- SCARTAZZINI, L. **Estudo da atividade antifúngica do óleo essencial de menta incorporado em coberturas comestíveis à base de gelatina para aplicação em morango (*Fragaria x ananassa*)**. 2018. 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/198790>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- TAVARES, T. S. **Revestimento de quitosana na manutenção da qualidade pós-colheita de morangos**. 2015. UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 2015. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/5575>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- UGALDE, M. L. **Biofilmes ativos com incorporação de óleos essenciais**. 2014. 168 f. 2014. Disponível em: [http://www.uricer.edu.br/cursos/arq\\_trabalhos\\_usuario/2568.pdf](http://www.uricer.edu.br/cursos/arq_trabalhos_usuario/2568.pdf). Acesso em: 15 mar. 2021.
- VELICKOVA, E., WINKELHAUSEN, E., KUZMANOVA, S., et al. "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, n. 2, p. 80–92, 2013. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.02.004. .

WATTANASATCHA, A., RENGPIPAT, S., WANICHWECHARUNGRUANG, S.  
"Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent", **International  
Journal of Pharmaceutics**, v. 434, n. 1–2, p. 360–365, 2012. DOI:  
10.1016/j.ijpharm.2012.06.017.