

Mirella Romanelli Vicente Bertolo

Desenvolvimento e aplicação de novos materiais poliméricos à base de quitosana, gelatina e extrato de casca de romã (*Punica Granatum* L.) para revestimento e melhoria da qualidade pós-colheita de morangos (*Fragaria × ananassa* Duch.)

Versão revisada

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Stanislau Bogusz Junior

São Carlos

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura:

Mirella Romanelli v. Bertolo

Data: 08/03/2024

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Bertolo, Mirella Romanelli Vicente

Desenvolvimento e aplicação de novos materiais poliméricos à base de quitosana, gelatina e extrato de casca de romã (*Punica Granatum* L.) para revestimento e melhoria da qualidade pós-colheita de morangos (*Fragaria × ananassa* Duch.) / Mirella Romanelli Vicente Bertolo. — São Carlos, 2024.

259 f.

Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2024.

Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Stanislaw Bogusz Junior

1. Morango. 2. Polímeros naturais. 3. Revestimentos comestíveis. 4. Pós-colheita. 5. Quitosana. I. Título.



*Dedico este trabalho aos meus pais, Eliane e Luiz (em memória),
que apesar de todas as dificuldades nunca deixaram de me
proporcionar uma educação de qualidade e de me apoiar em
todas as escolhas.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais, Eliane e Luiz, e à minha avó, Maria do Carmo, por toda a dedicação, carinho e suporte ao longo de todos esses anos de estudo.

Ao meu pai, em especial, que não pôde estar presente no fechamento deste ciclo, mas deve estar acompanhando tudo de perto.

Ao meu companheiro, Renan Lima Cagnoto, pelo apoio, carinho e entusiasmo nos momentos mais difíceis deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Stanislau Bogusz Junior, pelo conhecimento, tempo e suporte dedicados em minha orientação ao longo do meu doutorado.

À Dra. Virginia da Conceição Amaro Martins, pela amizade, apoio, conhecimento e valiosos ensinamentos ao longo dos últimos 9 anos.

À Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis, pelo apoio, conhecimento e suporte desde o começo de minha carreira acadêmica.

Aos amigos do Laboratório 08, em especial ao Dr. Murilo Álison Vigilato Rodrigues, à Dra. Marília Marta Horn, à Dra. Livia Contini Massimino e ao Dr. Eduardo Pedro Milan, pela amizade, apoio e parcerias.

Aos amigos, pelo apoio e torcida pela realização deste trabalho.

Aos companheiros do Grupo de Química Analítica e Inorgânica, pelos momentos de convivência no laboratório.

Ao Dr. Josemar Gonçalves de Oliveira Filho, pela parceria com os ensaios com os morangos na EMBRAPA Instrumentação.

Ao Dr. Lucas Danilo Dias, pela parceria com os ensaios de terapia fotodinâmica.

À Profa. Dra. Alyson E. Mitchell, pela recepção em seu laboratório, pela parceria e por todo o conhecimento adquirido ao longo dos 6 meses no estágio no exterior.

Aos técnicos da Central de Análises Químicas Instrumentais, professores, bibliotecárias, funcionários do serviço de pós-graduação e demais funcionários do Instituto de Química de São Carlos, por toda a assistência oferecida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelas bolsas concedidas no país e no exterior (processos 2019/18748-8 e 2022/04977-8, respectivamente). As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida no começo do doutorado (140406/2019-0), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo apoio para a realização deste trabalho.

E a todos que torceram e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.” (Leonardo da Vinci).

RESUMO

BERTOLO, Mirella Romanelli Vicente. Desenvolvimento e aplicação de novos materiais poliméricos à base de quitosana, gelatina e extrato de casca de romã (*Punica Granatum* L.) para revestimento e melhoria da qualidade pós-colheita de morangos (*Fragaria × ananassa* Duch.). 2024. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2024.

As perdas pós-colheita de alimentos são definidas como modificações ou reduções mensuráveis em sua qualidade e/ou quantidade, depois de colhidos, que os tornam inadequados para o consumo humano. Na prática, são decorrentes de doenças causadas por fungos e bactérias, desordens fisiológicas e danos físicos às frutas. Novas tecnologias de conservação de baixo custo vêm sendo desenvolvidas para reduzir as perdas pós-colheita de alimentos, como o uso de revestimentos poliméricos naturais. Desta forma, o objetivo geral desta tese foi o desenvolvimento de revestimentos à base de quitosana, gelatina e extrato de casca de romã para a manutenção da qualidade físico-química, microbiológica e sensorial de morangos. A formulação do revestimento foi otimizada com o auxílio de ferramentas quimiométricas, e o revestimento contendo 0,8% de quitosana, 0,2% de gelatina e 1 mg g⁻¹ de extrato de casca de romã foi aplicado em morangos em seu período pós-colheita. As propriedades físico-químicas e microbiológicas dos frutos revestidos foram comparadas às de frutos controle (sem revestimento). Os frutos revestidos apresentaram menores porcentagens de perda de massa e de contaminação fúngica ao longo do armazenamento, e mantiveram sua coloração e sua firmeza. O revestimento também desacelerou as quedas nas taxas respiratórias dos frutos e em seu perfil de compostos bioativos e voláteis. Um teste sensorial de diferença do controle foi conduzido com provadores treinados, os quais não conseguiram diferenciar os frutos não recobertos dos recobertos com os revestimentos desenvolvidos. O custo do revestimento também foi estimado, ficando em torno de R\$ 0,13/fruto. Além disso, novas possibilidades de estudo sobre o tema foram apresentadas: a aplicação do revestimento foi combinada com a aplicação de luz em terapia fotodinâmica, e os efeitos dessa combinação sobre as propriedades dos morangos foram avaliados. Além de não alterar a qualidade dos frutos, a combinação prolongou a vida útil dos morangos e melhorou sua segurança microbiana. Em outra vertente de estudo, os chamados solventes eutéticos naturais profundos (NADES) foram utilizados como meios alternativos e verdes de extração de compostos fenólicos da casca da romã, bem como de dois outros resíduos agroindustriais de importância econômica para o estado da Califórnia (local onde essa parte do estudo foi conduzida), a casca da amêndoa e o bagaço de sabugueiro. O NADES contendo cloreto de colina e ácido láctico foi o escolhido como o mais adequado para o estudo de otimização das extrações assistidas por ultrassom, para os três materiais. Este solvente apresentou melhores resultados em relação à concentração e à composição de fenólicos nos extratos, quando comparado à uma solução etanólica (60%, v/v). Tais resultados abrem novas possibilidades para o uso de NADES como carreadores de fenólicos e como agentes plasticizantes em revestimentos à base de quitosana e gelatina.

Palavras-chave: quitosana, gelatina, extrato de casca de romã, morangos, pós-colheita, revestimentos, terapia fotodinâmica, NADES.

ABSTRACT

BERTOLO, Mirella Romanelli Vicente. Development and application of new polymeric materials based on chitosan, gelatin, and pomegranate (*Punica Granatum* L.) peel extract for coating and improving the post-harvest quality of strawberries (*Fragaria × ananassa* Duch.). 2024. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2024.

Post-harvest losses are defined as measurable changes or reductions in food quality and/or quantity, after being harvested, that make them unsuitable for human consumption. In practice, they result from diseases caused by fungi and bacteria, physiological disorders, and physical damage to fruits. New low-cost conservation technologies have been developed to reduce post-harvest food losses, like the use of natural polymeric coatings. Thus, the main aim of this thesis was the development of coatings based on chitosan, gelatin, and pomegranate peel extract to maintain the physical-chemical, microbiological, and sensorial quality of strawberries. The coating formulation was optimized with the aid of chemometric tools, and the coating containing 0.8% chitosan, 0.2% gelatin and 1 mg g⁻¹ pomegranate peel extract was applied to strawberries in their post-harvest period. The physical-chemical and microbiological properties of coated fruits were compared to those of control fruits (without coating). The coated fruits showed lower percentages of weight loss and fungal contamination throughout storage and maintained their color and firmness. The coating also slowed the declines in the respiratory rates of the fruits and in their profile of bioactive and volatile compounds. A sensory difference from control test was conducted with trained tasters, who were unable to differentiate uncoated fruits from those covered with the developed coatings. The cost of the coating was also estimated, being around R\$0.13/fruit. Furthermore, new possibilities for studying the topic were presented: the application of the coating was combined with the application of light in photodynamic therapy, and the effects of this combination on the properties of strawberries were evaluated. In addition to not altering the quality of the fruits, the combination extended the shelf life of the strawberries and improved their microbial safety. In another aspect of study, the so-called natural deep eutectic solvents (NADES) were used as alternative and green means of extracting phenolic compounds from pomegranate peel, as well as two other agro-industrial residues of economic importance for the state of California (where this part of the study was conducted), almond hulls and elderberry pomace. NADES containing choline chloride and lactic acid was chosen as the most suitable for the optimization study of ultrasound-assisted extractions for the three materials. This solvent showed better results in relation to the concentration and composition of phenolics in the extracts, when compared to an ethanolic solution (60%, v/v). Such results open new possibilities for the use of NADES as phenolic carriers and as plasticizing agents in chitosan and gelatin-based coatings.

Keywords: chitosan, gelatin, pomegranate peel extract, strawberries, postharvest, coatings, photodynamic therapy, NADES.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

Figura 1.1. Frutos de mamão com injúrias visíveis acondicionados em caixotes de madeira.	36
Figura 1.2. Morfologia do morango.....	39
Figura 1.3. Representação da ação de um revestimento sobre os estômatos e lenticelas dos frutos, formando uma barreira semipermeável à passagem de gases e água.	43
Figura 1.4. Número de artigos publicados (2000-2022) com os termos “revestimentos comestíveis” e “revestimentos comestíveis” + “morangos” como tópicos (título, resumo ou palavras-chave).....	45
Figura 1.5. Estruturas químicas da quitina e da quitosana.	47
Figura 1.6. Representação esquemática das diferentes estruturas polimórficas da quitina.....	48
Figura 1.7. Mecanismo proposto para a atividade antimicrobiana da quitosana.	49
Figura 1.8. Número de artigos publicados (2000-2022) com os termos “revestimentos comestíveis” + “quitosana” como tópicos (título, resumo ou palavras-chave).....	50
Figura 1.9. Estrutura química do colágeno e representação da obtenção da gelatina.....	51
Figura 1.10. Número de artigos publicados (2010-2022) com os termos “revestimentos comestíveis” + “compostos fenólicos” como tópicos (título, resumo ou palavras-chave).....	53
Figura 1.11. Frutos da romã.	54
Figura 1.12. Estrutura química dos principais fenólicos encontrados na casca da romã: (a) ácido gálico, (b) ácido cafeico, (c) ácido clorogênico, (d) ácido elágico, (e) epicatequina, (f) rutina e (g) punicalagina.	56

Capítulo 2

Figura 2.1. Fotografia digital do extrato de casca de romã em pó.....	71
Figura 2.2. Espectro de FTIR-ATR do extrato de casca de romã.....	72

Figura 2.3. Porcentagens de inibição de diferentes concentrações do extrato de casca de romã e do antioxidante comercial BHT (em $\mu\text{g mL}^{-1}$) contra o radical DPPH ($R^2 = 0,9996$ para a curva do extrato, $R^2 = 0,9955$ para a curva do BHT).	73
Figura 2.4. Espectros de absorção no UV-Vis para o extrato de casca de romã ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) em (A) diferentes pH (3, 7 e 11) e (B) diferentes temperaturas (4, 25 e 37 °C).....	74
Figura 2.5. Fotografia digital da quitosana em pó.....	76
Figura 2.6. Diagrama de Pareto (A) e gráfico de superfície de resposta (B) para o conteúdo total de fenólicos das amostras do DCCR.	80
Figura 2.7. Diagrama de Pareto (A) e gráfico de superfície de resposta (B) para a viscosidade das amostras do DCCR.	81
Figura 2.8. Diagrama de Pareto (A) e gráfico de superfície de resposta (B) para a solubilidade das amostras do DCCR.....	82
Figura 2.9. Diagrama de Pareto (A) e gráfico de superfície de resposta (B) para a opacidade das amostras do DCCR.	83
Figura 2.10. Diagrama de Pareto (A) e gráfico de superfície de resposta (B) para a TPVA das amostras do DCCR.	84
Figura 2.11. Halos de inibição da amostra 12 contra: (A) <i>R. stolonifer</i> e (B) <i>B. cinerea</i>	85
Capítulo 3	
Figura 3.1. Módulos G' (símbolo aberto) e G'' (símbolo fechado) das misturas QG (■) e QGE (■) em função de: (A) % de deformação, (B) frequência angular e (C) temperatura.	94
Figura 3.2. Viscosidade em função da taxa de cisalhamento em diferentes temperaturas para: (A) QG e (B) QGE.	97
Figura 3.3. (A) espectros FTIR-ATR e (B) espectros Raman dos filmes QG (—) e QGE (—).	100
Figura 3.4. Imagens de MEV das superfícies de (A) QG e (B) QGE, ambas com aumento de 500 x; imagens de MEV das superfícies de secção transversal de (C) QG e (D) QGE, ambas com aumento de 5.000 x.	101

Figura 3.5. Perfis de solubilidade e intumescimento dos filmes QG e QGE ao longo do tempo.	102
Figura 3.6. Perfis de molhabilidade da gota de água sobre a superfície de: (A) QG e (B) QGE.....	103
Figura 3.7. Transmitância dos filmes QG (—) e QGE (—) na região do UV-Vis.....	104
Figura 3.8. Gráficos de liberação do extrato de casca de romã pelo filme QGE em: (A) diferentes pH e (B) diferentes temperaturas.....	108
Capítulo 4	
Figura 4.1. (A) perda de massa e (B) contaminação fúngica dos morangos revestidos e não revestidos, ao longo dos 12 dias de armazenamento refrigerado.....	121
Figura 4.2. Fotografia digital dos morangos revestidos e não revestidos, nos dias (A) 0, (B) 6 e (C) 12 de armazenamento refrigerado.....	121
Figura 4.3. Firmeza (em N) dos morangos revestidos e não revestidos ao longo dos 12 dias de armazenamento refrigerado.....	124
Figura 4.4. Quociente respiratório (QR) dos morangos revestidos e não revestidos ao longo dos dias de armazenamento.....	127
Figura 4.5. (A) Número total de picos e (B) área total dos cromatogramas obtidos pela extração dos voláteis dos morangos com uso das cinco diferentes fibras de SPME testadas.....	132
Figura 4.6. Áreas dos (A) ésteres, (B) álcoois e (C) aldeídos majoritários dos morangos do grupo controle ao longo do armazenamento.	140
Figura 4.7. Áreas dos cinco compostos majoritários dos morangos do grupo controle nos dias (A) 0, (B) 6 e (C) 12 de análise.	141
Figura 4.8. Áreas dos (A) ésteres, (B) álcoois e (C) aldeídos majoritários dos morangos do grupo QG ao longo do armazenamento.	144
Figura 4.9. Áreas dos cinco compostos majoritários dos morangos do grupo QG nos dias (A) 0, (B) 6 e (C) 12 de análise.	145
Figura 4.10. Áreas dos (A) ésteres, (B) álcoois e (C) aldeídos majoritários dos morangos do grupo QGE ao longo do armazenamento.	148

Figura 4.11. Áreas dos cinco compostos majoritários dos morangos do grupo QGE nos dias (A) 0, (B) 6 e (C) 12 de análise.	149
Figura 4.12. Escalas de severidade adotadas para os morangos lesionados com: (A) esporos do fungo <i>R. stolonifer</i> e (B) esporos do fungo <i>B. cinerea</i>	150
Figura 4.13. Comparativo dos morangos revestidos e não revestidos lesionados com o fungo <i>R. stolonifer</i> nos dias (A) 3 e (B) 9 do armazenamento.	151
Figura 4.14. Comparativo dos morangos revestidos e não revestidos lesionados com o fungo <i>B. cinerea</i> nos dias (A) 3 e (B) 9 do armazenamento.	152
Figura 4.15. Gráficos de barras com a escala de severidade das lesões representada por cores, para os morangos contaminados com: (A) <i>R. stolonifer</i> e (B) <i>B. cinerea</i>	153
Figura 4.16. Cabine de aplicação do teste sensorial para os morangos.	154
Figura 4.17. Estimativa do custo das principais etapas envolvidas na produção e na aplicação dos revestimentos dos morangos.	156
Capítulo 5	
Figura 5.1. Aplicação de luz verde nos morangos com o aparelho Biotable®.	165
Figura 5.2. Fotodegradação induzida pela aplicação de doses cumulativas de luz verde (em 525 nm) para: (A) extrato de casca de romã e (B) filme QGE.	167
Figura 5.3. (A) Adesão de <i>S. aureus</i> , em log UFC mL ⁻¹ , na superfície dos filmes QG e QGE, em relação ao controle. Em (B), sobrevivência de <i>S. aureus</i> após contato com o extrato de casca de romã (em 3 diferentes concentrações) e com os filmes QG e QGE, com e sem aplicação de luz (em 525 nm, 50 J cm ⁻²).	169
Figura 5.4. Efeito de diferentes concentrações (10, 50, 100, 200 e 500 mg L ⁻¹) de QG e QGE, comparadas a um controle positivo e a um controle negativo, sobre (A) a taxa de germinação das sementes e (B) o alongamento da raiz dos organismos teste <i>A. cepa</i>	171
Figura 5.5. Efeito de diferentes concentrações (10, 50, 100, 200 e 500 mg L ⁻¹) de QG e QGE, comparadas a um controle positivo e a um controle negativo, sobre (A) índice mitótico, (B) frequência de anomalias cromossômicas e (C) frequência de micronúcleos de células meristemáticas dos organismos teste <i>A. cepa</i>	173

Figura 5.6. (A) Perda de massa e contaminação fúngica para os morangos não revestidos e revestidos, durante os oito dias de armazenamento após a aplicação da luz. Os frutos submetidos à aplicação de luz estão incluídos nos grupos “luz” (a 525 nm, 10 J cm⁻²; em ambos os lados), e os não submetidos à aplicação de luz estão incluídos nos grupos “escuras”. (B) Conteúdo total de fenólicos (em µg EAG g⁻¹ morango) para os frutos controle e QGE, dos grupos luz e escuro, durante os oito dias de armazenamento..... 176

Figura 5.7. Sobrevivência de *S. aureus*, em log UFC mL⁻¹, na superfície dos morangos não revestidos e revestidos com QG e QGE, com e sem aplicação de luz (a 525 nm, 50 J cm⁻²). 178

Capítulo 6

Figura 6.1. Da esquerda para a direita: CC-CIT, CC-ASC e CC-LAT..... 190

Figura 6.2. (A) Espectros UV-vis (400 - 800 nm) obtidos para os diferentes NADES e para a solução etanólica 60% (v/v) após a diluição do corante Vermelho do Nilo. (B) Valores de E_{NR} (em kcal mol⁻¹) para os três NADES preparados neste estudo (CC-CIT, CC-ASC e CC-LAT), a solução etanólica 60% (v/v) usada como meio extrativo de comparação, e quatro solventes convencionais (barras vazias) usados na extração de compostos fenólicos (água, etanol, metanol e hexano). 192

Figura 6.3. Extratos de (A) casca de romã, (B) casca de amêndoa e (C) bagaço de sabugueiro obtidos com CC-CIT, CC-ASC, CC-LAT e etanol 60% (v/v) (da esquerda para a direita). 195

Figura 6.4. Extratos de (A) casca de romã, (B) casca de amêndoa e (C) bagaço de sabugueiro obtidos com o delineamento Box-Behnken, usando CC-LAT como NADES, e seus respectivos conteúdos de fenólicos totais (em mg EAG g⁻¹, para os extratos de casca de romã e de casca de amêndoa) e antocianinas totais (em µg cianidina-3-glicosídeo g⁻¹, para os extratos de sabugueiro). 199

Figura 6.5. Diagramas de Pareto obtidos a partir dos resultados do delineamento Box-Behnken para as extrações de casca de romã (A), casca de amêndoa (E) e bagaço de sabugueiro (I), respectivamente; gráficos de superfície de resposta para temperatura *versus* tempo (razão NADES/sólido = 20 g/g), temperatura *versus* razão NADES/sólido (tempo = 40 min) e tempo *versus* razão NADES/sólido

(temperatura = 40 °C), para: (B-D) casca de romã, (F-H) casca de amêndoa e (J-L) bagaço de sabugueiro, respectivamente.202

Apêndices

Figura A1. Curva de calibração de ácido gálico em água para o ensaio de Folin Ciocalteu ($R^2 = 0,9997$).238

Figura A2. Curva de calibração de Trolox em etanol para o ensaio do radical ABTS ($R^2 = 0,9994$).239

Figura A3. Espectro de RMN ^1H da quitosana preparada.240

Figura A4. Gráfico de índice de refração diferencial versus concentração da amostra para a determinação do dn/dc da quitosana. (B) Cromatograma com a distribuição da massa molar da quitosana em função do tempo.241

Figura A5. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Consumidores.242

Figura A6. Ficha de avaliação utilizada pelos provadores durante o teste de análise sensorial.243

Figura A7. Estruturas químicas dos revestimentos das fibras de SPME utilizadas para a extração de compostos voláteis dos morangos: (A) PDMS, (B) DVB, (C) PA.244

Figura A8. Cromatograma ilustrativo dos compostos voláteis extraídos dos morangos com a fibra DVB-CAR-PDMS.245

Figura A9. Cromatogramas dos extratos de casca de romã (280 nm), casca de amêndoa (280 nm) e bagaço de sabugueiro (520 nm) obtidos com CC-LAT (A, C e E, respectivamente) e etanol 60% (v/v) (B, D e F, respectivamente), todos diluídos 1:8 em ácido fosfórico 1,5% (v/v).246

Anexos

Anexo I. Cópia da permissão do periódico Food Packaging and Shelf Life para a reprodução dos resultados do artigo “Central composite design optimization of active and physical properties of food packaging films based on chitosan/gelatin/pomegranate peel extract”251

Anexo II. Cópia do depósito do pedido de patente referente à invenção BR 10 2021 026404 (em destaque).252

Anexo III. Cópia do parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) para a condução do teste de análise sensorial.....	253
Anexo IV. Cópia da permissão do periódico International Journal of Biological Macromolecules para a reprodução dos resultados do artigo “Photoantimicrobial chitosan-gelatin-pomegranate peel extract films for strawberries preservation: From microbiological analysis to in vivo safety assessment”.....	257
Anexo V. Cópia do certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais para a condução dos ensaios <i>in vivo</i> com peixe-zebra.	258
Anexo VI. Cópia da permissão do periódico ACS Food Science and Technology para a reprodução dos resultados do artigo “Green strategies for recovery of bioactive phenolic compounds from agro-industrial wastes (pomegranate peels, almond hulls, and elderberry pomace) using natural deep eutectic solvents”.	259

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.1. Principais polímeros empregados em materiais de revestimento e as vantagens e desvantagens do seu uso no recobrimento de alimentos.44

Tabela 1.2. Revestimentos comestíveis à base de diferentes polímeros e seus efeitos como recobrimentos de morangos.....46

Tabela 1.3. Revestimentos comestíveis à base de quitosana contendo extratos de casca de romã e seus efeitos sobre os alimentos revestidos.....57

Capítulo 2

Tabela 2.1. Variáveis estudadas no DCCR para a otimização das proporções entre os três componentes dos revestimentos (quitosana, gelatina e extrato de casca de romã), com seus respectivos fatores, níveis e domínio experimental codificados e reais.....66

Tabela 2.2. Matriz do DCCR adotada para a otimização das proporções entre os três componentes dos revestimentos poliméricos, com os valores reais e codificados das variáveis adotadas no preparo de cada uma das 12 misturas.66

Tabela 2.3. Valores de comprimento de onda (λ) e de absorbância máxima (A) para as bandas B e C dos espectros de absorção do extrato de casca de romã, em diferentes pH (3, 7 e 11) e em diferentes temperaturas (4, 25 e 37 °C).....75

Tabela 2.4. Resultados obtidos para as análises conduzidas com as 12 misturas do DCCR, adotado para a escolha das concentrações ideais de quitosana, gelatina e extrato de casca de romã nos revestimentos.79

Capítulo 3

Tabela 3.1. Parâmetros obtidos pelos ensaios reológicos de deformação e de frequência para as amostras QG e QGE.....95

Tabela 3.2. Parâmetros obtidos pelos ensaios reológicos de fluxo para as amostras QG e QGE.....98

Tabela 3.3. Solubilidade, intumescimento, teor de umidade e ângulo de contato para os filmes QG e QGE..... 102

Tabela 3.4. Propriedades ópticas (L^* : luminosidade, h° : ângulo Hue, C^* : cromaticidade e ΔE : diferença total de cor) e propriedades mecânicas (T: resistência à tração e ER: alongação na ruptura) dos filmes QG e QGE. 105

Tabela 3.5. CIM e CBM do extrato de casca de romã e das soluções formadoras dos filmes QG e QGE contra as bactérias *S. aureus* (Gram-positiva) e *S. enteritidis* (Gram-negativa). 107

Capítulo 4

Tabela 4.1. Parâmetros de cor (L^* , C^* , h° e ΔE) para os morangos controle (não revestidos), QG e QGE ao longo dos 12 dias de armazenamento refrigerado. 122

Tabela 4.2. Teor de sólidos solúveis ($^\circ$ Brix), acidez titulável e pH dos morangos revestidos e não revestidos ao longo dos 12 dias de armazenamento refrigerado..... 126

Tabela 4.3. Compostos bioativos (conteúdo total de fenólicos, antocianinas e vitamina C) e atividade antioxidante (% de inibição) contra o radical DPPH dos morangos revestidos e não revestidos ao longo dos 12 dias de armazenamento refrigerado..... 129

Tabela 4.4. Compostos voláteis identificados nos morangos, seus LTPRI calculados e da literatura, a diferença entre eles (Δ), e as fibras empregadas para sua extração..... 134

Tabela 4.5. Número de compostos identificados e área total de compostos para os morangos dos grupos controle, QG e QGE ao longo do tempo. 138

Tabela 4.6. Média dos valores atribuídos para os morangos revestidos e não revestidos no teste sensorial de diferença do controle..... 154

Tabela 4.7. Resultados da ANOVA aplicada aos valores atribuídos pelos provadores aos morangos no teste sensorial de diferença do controle. 155

Capítulo 6

Tabela 6.1. Variáveis codificadas e reais (temperatura, tempo e razão NADES/sólido) empregadas no DBB (três níveis e três fatores) para a otimização das condições de extração de compostos fenólicos de cascas de romã, cascas de amêndoas e bagaço de sabugueiro. 188

Tabela 6.2. Valores de pH, densidade, comprimento de onda de absorbância máxima (λ_{\max}) e valores de energia de transição (E_{NR}) (a 25 °C) de CC-CIT, CC-ASC, CC-LAT, comparados à solução etanólica 60% (v/v)..... 191

Tabela 6.3. Conteúdo total de fenólicos, atividade antioxidante contra o radical livre DPPH e teor total de antocianinas para os extratos de casca de romã, casca de amêndoa e bagaço de sabugueiro obtidos com CC-CIT, CC-LAT e a solução etanólica 60% (v/v)..... 194

Tabela 6.4. Resultados da ANOVA para o delineamento Box-Behnken conduzido para otimizar as extrações das cascas de romã, cascas de amêndoa e bagaço de sabugueiro com o CC-LAT..... 201

Tabela 6.5. Curvas de calibração dos padrões fenólicos analisados por HPLC-DAD, com suas respectivas equações lineares, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e coeficientes de correlação (R^2)..... 205

Tabela 6.6. Concentrações (em $\mu\text{g g}^{-1}$) dos compostos fenólicos nos extratos otimizados de casca de romã, casca de amêndoa e bagaço de sabugueiro, determinadas por HPLC-DAD. 206

Apêndices

Tabela A1. Parâmetros utilizados no cálculo da massa molar viscosimétrica da quitosana..... 247

Tabela A2. Resultados da ANOVA para o DCCR conduzido para otimizar a composição das misturas de quitosana, gelatina e extrato de casca de romã quanto ao seu conteúdo total de fenólicos, viscosidade, solubilidade, opacidade e TPVA..... 248

Tabela A3. Parâmetros físico-químicos da água a cada leitura de mortalidade dos peixe-zebra, para os três grupos analisados (controle, QGE 10, 50 e 100 mg L ⁻¹ , e QG 100 mg L ⁻¹).....	249
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABTS – radical 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
- ANOVA – análise de variância
- aPDT – *antimicrobial photodynamic therapy*
- ASC – ácido ascórbico
- BDA – ágar batata dextrose
- BHT – hidroxitolueno butilado
- CAR-PDMS – carboxen®
- CBM – concentração bactericida mínima
- CC – cloreto de colina
- CC-ASC – NADES à base de cloreto de colina e ácido ascórbico
- CC-CIT – NADES à base de cloreto de colina e ácido cítrico
- CC-LAT – NADES à base de cloreto de colina e ácido láctico
- CG-MS – cromatografia gasosa acoplada a detector espectrométrico de massas
- CIM – concentração inibitória mínima
- CIT – ácido cítrico (CIT)
- CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- CN – controle negativo
- CP – controle positivo
- DBB – delineamento Box-Behnken
- DCC – delineamento composto central
- DCF1 – 2,6-diclorofenol indofenol
- DES – *deep eutectic solvents*
- DPPH – radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- DVB-CAR-PDMS – divinilbenzeno/ carboxen®/ polidimetilsiloxano
- DVB-PDMS – divinilbenzeno/ polidimetilsiloxano
- E – extrato de casca de romã
- EAG – equivalente de ácido gálico
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EROs – espécies reativas de oxigênio

FAC – frequência de anomalia cromossômica

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FD – fator de diluição

FMA – frequência de micronúcleo

FTIR-ATR – espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada

G – gelatina

GA – grau de acetilação

GRAS – *generally recognized as safe*

HPLC-DAD – cromatografia líquida à alta pressão acoplada a detector de arranjo de diodos

HS-SPME – *headspace solid-phase microextraction*

IAA – índice de atividade antioxidante

IAR – índice de alongamento radicular

IFSC – Instituto de Física de São Carlos

IM – índice mitótico

IQSC – Instituto de Química de São Carlos

LAT – ácido láctico

LOD – limite de detecção

LOQ – limite de quantificação

LTPRI – *linear temperature programmed retention indexes*

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MHB – caldo Mueller Hinton

NADES – *natural deep eutectic solvents*

ODS – Objetivos para o Desenvolvimento Sustentável

PA – poliacrilato

PDMS – polidimetilsiloxano

Q – quitosana

QG – revestimento contendo 0,8% de quitosana e 0,2% de gelatina

QGE – revestimento contendo 0,8% de quitosana, 0,2% de gelatina e 1 mg g⁻¹ de extrato de casca de romã

QR – quociente respiratório

RMN – espectroscopia por ressonância magnética nuclear

RVL – região viscoelástica linear

TG – taxa de germinação

TPVA – taxa de permeabilidade ao vapor d'água

TRF – herbicida trifluralina

TTA – teor total de antocianinas

UFC – unidades formadoras de colônia

UNICEP – Centro Universitário Central Paulista

UR – umidade relativa

LISTA DE SÍMBOLOS

$[\eta]$ – viscosidade intrínseca

°Brix – % de sacarose

a_w – atividade de água

C^* – cromaticidade (C^*)

E_a – energia de ativação

E_{NR} – energia de transição

ER – elongação na ruptura

G' – módulo elástico

G'' – módulo viscoso

$G'_{\text{cruzamento}}$ – módulo elástico no cruzamento

G'_{LVR} – módulo elástico na deformação crítica

h° – ângulo de tonalidade ou ângulo Hue

IC_{20} – concentração necessária para inibir 20% do radical DPPH

IC_{50} – concentração necessária para inibir 50% do radical DPPH

k – índice de consistência

L^* – luminosidade

M – massa molar viscosimétrica média

n – índice de taxa

pH – potencial hidrogeniônico

pKa – logaritmo negativo da constante de dissociação ácida

R – constante universal dos gases perfeitos

R^2 – coeficiente de determinação

SS – conteúdo de sólidos solúveis

T – resistência à tração

$\tan\delta$ – fator de perda

γ – taxa de cisalhamento

γ_L – deformação crítica

ΔE – diferença total de cor

Δp – diferença da pressão de vapor da água

ε – coeficiente de extinção molar

η_0 – viscosidade no platô newtoniano a zero de cisalhamento

η^∞ – viscosidade máxima a cisalhamento infinito

λ – comprimento de onda

$\omega_{\text{cruzamento}}$ – frequência angular de cruzamento dos módulos G' e G''

PREFÁCIO

Esta tese foi dividida em sete capítulos. O Capítulo 1 apresenta uma revisão sobre o uso de revestimentos naturais para a conservação de frutas durante seu período pós-colheita. O Capítulo 2 reporta o desenvolvimento e a otimização dos revestimentos à base de quitosana, gelatina e extrato de casca de romã, e o Capítulo 3 reporta a caracterização do revestimento otimizado em comparação com um revestimento sem extrato. Os efeitos desses revestimentos sobre as propriedades físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de morangos são reportados no Capítulo 4. O Capítulo 5 apresenta a combinação dos revestimentos desenvolvidos com a terapia fotodinâmica e seus efeitos sobre as propriedades físico-químicas e microbiológicas de morangos revestidos (esta parte do estudo foi realizada em parceria com pesquisadores do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP)). O Capítulo 6 reporta o estudo do uso de solventes eutéticos naturais profundos (ou NADES, sigla proveniente do nome em inglês) na extração de compostos fenólicos de resíduos agroindustriais de casca de romã, cascas de amêndoas e de bagaço de sabugueiro (esta parte do estudo foi desenvolvida durante o Estágio de Pesquisa no Exterior, no laboratório da Profa. Dra. Alyson Mitchell, do *Food Science and Technology Department* da *University of California – Davis*). Por fim, o Capítulo 7 apresenta uma conclusão geral da tese, bem como perspectivas de trabalhos futuros.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - O USO DE REVESTIMENTOS NATURAIS PARA A MANUTENÇÃO DA QUALIDADE DE FRUTAS EM SEU PERÍODO PÓS-COLHEITA	33
1. PERDAS PÓS-COLHEITA DE FRUTAS E HORTALIÇAS	34
1.1 Perdas na colheita	35
1.2 Perdas no transporte	35
1.3 Perdas no armazenamento	36
1.4 Perdas devido às más práticas de acondicionamento e embalagem	37
1.5 Desperdício no varejo e no momento do consumo	38
2. MORANGOS	38
3. USO DE REVESTIMENTOS POLIMÉRICOS NATURAIS PARA O RECOBRIMENTO DE FRUTAS	41
3.1 Quitosana	46
3.2 Gelatina.....	50
4. INCORPORAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PROVENIENTES DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NOS REVESTIMENTOS.....	52
4.1 Extrato de casca de romã.....	53
CAPÍTULO 2 - OTIMIZAÇÃO DOS REVESTIMENTOS POLIMÉRICOS DE QUITOSANA, GELATINA E EXTRATO DE CASCA DE ROMÃ.....	58
1. INTRODUÇÃO	59
2. MATERIAIS E MÉTODOS	60
2.1 Materiais	60
2.2 Obtenção e caracterização do extrato de casca de romã	60
2.2.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	60
2.2.2 Conteúdo total de fenólicos	61
2.2.3 Ensaio antioxidante frente ao radical ABTS.....	61

2.2.4 Ensaio antioxidante frente ao radical livre DPPH	62
2.2.5 Estabilidade do extrato em função do pH e da temperatura	62
2.3 Obtenção e caracterização da quitosana.....	63
2.3.1 Grau de acetilação da quitosana por RMN ¹ H	63
2.3.2 Massa molar viscosimétrica média	64
2.3.3 Massa molar absoluta.....	64
2.4 Design experimental para otimização das proporções das misturas poliméricas dos revestimentos	65
2.5 Respostas avaliadas no DCCR	67
2.5.1 Conteúdo total de fenólicos	67
2.5.2 Viscosidade	68
2.5.3 Espessura, solubilidade e opacidade.....	68
2.5.4 Taxa de permeabilidade ao vapor d'água (TPVA).....	69
2.5.5 Atividade antimicrobiana.....	69
2.6 Análise estatística.....	70
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	71
3.1 Obtenção e caracterização do extrato de casca de romã	71
3.2 Obtenção e caracterização da quitosana.....	76
3.3 Design experimental para otimização das proporções das misturas poliméricas dos revestimentos	77
3.3.1 Conteúdo total de fenólicos	80
3.3.2 Viscosidade	80
3.3.3 Solubilidade e opacidade.....	82
3.3.4 TPVA.....	83
3.3.5 Atividade antimicrobiana.....	84
4. CONCLUSÕES	86

CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO DOS REVESTIMENTOS POLIMÉRICOS DE QUITOSANA, GELATINA E EXTRATO DE CASCA DE ROMÃ.....	87
1. INTRODUÇÃO	88
2. MATERIAIS E MÉTODOS	89
2.1 Preparo dos filmes QG e QGE	89
2.2 Estudo reológico.....	89
2.3 Análises espectroscópicas e morfológicas.....	90
2.4 Solubilidade, intumescimento, teor de umidade e ângulo de contato.....	90
2.5 Propriedades ópticas e ensaios mecânicos.....	91
2.6 Propriedades ativas.....	91
2.7 Estudo de lixiviação dos filmes em função do pH e temperatura	92
2.8 Análise estatística.....	93
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	94
3.1 Estudo reológico.....	94
3.2 Análises espectroscópicas e morfológicas.....	99
3.3 Solubilidade, intumescimento, teor de umidade e ângulo de contato.....	101
3.4 Propriedades ópticas e ensaios mecânicos.....	104
3.5 Propriedades ativas.....	106
3.6 Estudo de lixiviação dos filmes em função do pH e temperatura	107
4. CONCLUSÕES	109
CAPÍTULO 4 - PRESERVAÇÃO DOS ATRIBUTOS FÍSICO-QUÍMICOS, MICROBIOLÓGICOS, BIOATIVOS, SENSORIAIS E DO PERFIL DE VOLÁTEIS DE MORANGOS RECOBERTOS COM OS REVESTIMENTOS DE QUITOSANA, GELATINA E EXTRATO DE CASCA DE ROMÃ.....	110
1. INTRODUÇÃO	111
2. MATERIAIS E MÉTODOS	112

2.1 Aplicação dos revestimentos nos morangos	112
2.2 Parâmetros físico-químicos dos morangos	112
2.2.1 <i>Perda de massa e contaminação fúngica</i>	112
2.2.2 <i>Cor</i>	113
2.2.3 <i>Firmeza</i>	113
2.2.4 <i>Teor de sólidos solúveis, acidez titulável e pH</i>	113
2.3 Respiração	114
2.4 Compostos bioativos e atividade antioxidante	114
2.4.1 <i>Conteúdo total de fenólicos</i>	114
2.4.2 <i>Teor de antocianinas</i>	114
2.4.3 <i>Teor de vitamina C</i>	115
2.4.4 <i>Atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH</i>	115
2.5 Perfil de compostos voláteis	116
2.6 Teste do desafio	117
2.7 Análise sensorial	118
2.8 Estimativa do custo dos revestimentos	119
2.9 Análise estatística	119
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	120
3.1 Parâmetros físico-químicos dos morangos	120
3.1.1 <i>Perda de massa e contaminação fúngica</i>	120
3.1.2 <i>Cor</i>	122
3.1.3 <i>Firmeza</i>	124
3.1.4 <i>Teor de sólidos solúveis, acidez titulável e pH</i>	125
3.2 Respiração	127
3.3 Compostos bioativos e atividade antioxidante	128
3.4 Perfil de compostos voláteis	132

3.5 Teste do desafio.....	150
3.6 Análise sensorial	154
3.7 Estimativa do custo dos revestimentos.....	155
4. CONCLUSÕES	157
CAPÍTULO 5 - NOVAS POSSIBILIDADES: EFEITO FOTO ANTIMICROBIANO DOS REVESTIMENTOS DE QUITOSANA, GELATINA E EXTRATO DE CASCA DE ROMÃ NA QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE MORANGOS.....	158
1. INTRODUÇÃO	159
2. MATERIAIS E MÉTODOS	161
2.1 Materiais	161
2.2 Fotodegradação do extrato de casca de romã e dos revestimentos.....	161
2.3 Foto inativação de <i>S. aureus</i> pelo extrato de casca de romã e pelos revestimentos.....	162
2.4 Fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos revestimentos.....	162
2.5 Ensaio <i>in vivo</i> com peixe-zebra.....	164
2.6 Avaliação dos morangos.....	164
2.6.1 Perda de massa, contaminação fúngica e conteúdo total de fenólicos.....	165
2.6.2 Foto inativação de <i>S. aureus</i>	166
2.7 Análise estatística.....	166
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	167
3.1 Fotodegradação do extrato de casca de romã e dos revestimentos .	167
3.2 Foto inativação de <i>S. aureus</i> pelo extrato de casca de romã e pelos revestimentos.....	168
3.3 Fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos revestimentos.....	170

3.4 Ensaio <i>in vivo</i> com peixe-zebra	174
3.5 Avaliação dos morangos.....	175
3.5.1 Perda de massa, contaminação fúngica e conteúdo total de fenólicos.....	175
3.5.2 Foto inativação de <i>S. aureus</i>	178
4. CONCLUSÕES	180
CAPÍTULO 6 - NOVAS POSSIBILIDADES: ESTRATÉGIAS VERDES PARA RECUPERAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS BIOATIVOS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS (CASCAS DE ROMÃ, CASCAS DE AMÊNDOA E BAGAÇO DE SABUGUEIRO) USANDO SOLVENTES EUTÉTICOS NATURAIS PROFUNDOS	181
1. INTRODUÇÃO	182
2. MATERIAIS E MÉTODOS	185
2.1 Materiais	185
2.2 Preparo e caracterização dos NADES.....	185
2.3 Escolha do melhor NADES para a extração dos fenólicos	186
2.4 Planejamento experimental para a otimização da extração dos fenólicos	187
2.5 Caracterização dos extratos por HPLC-DAD.....	189
2.6 Análise estatística.....	189
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	190
3.1 Preparo e caracterização dos NADES.....	190
3.2 Escolha do melhor NADES para a extração dos fenólicos	193
3.3 Planejamento experimental para a otimização da extração dos fenólicos	198
3.4 Caracterização dos extratos por HPLC-DAD.....	205
4. CONCLUSÕES	208
CAPÍTULO 7 - CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	209

BIBLIOGRAFIA	212
APÊNDICES	237
ANEXOS	250

CAPÍTULO 1

O USO DE REVESTIMENTOS NATURAIS PARA A MANUTENÇÃO DA QUALIDADE DE FRUTAS EM SEU PERÍODO PÓS- COLHEITA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. PERDAS PÓS-COLHEITA DE FRUTAS E HORTALIÇAS

A ingestão de frutas e hortaliças é essencial em uma dieta balanceada, uma vez que estes alimentos são importantes fontes de proteínas, carboidratos, lipídios, fibras, vitaminas, minerais e compostos com atividade antioxidante como, por exemplo, compostos fenólicos, antocianinas e carotenoides (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2022b). Mesmo depois de colhidos, os tecidos vegetais de frutas e hortaliças apresentam processos metabólicos ativos, como a respiração celular, sendo, portanto, considerados tecidos vivos. Em função disso, são necessários cuidados especiais de boas práticas e técnicas de conservação pós-colheita por parte de produtores, transportadores, varejistas e consumidores, para que a qualidade destes alimentos seja mantida, evitando-se assim as chamadas perdas pós-colheita (BATISTA *et al.*, 2018).

As perdas de alimentos são definidas como modificações ou reduções mensuráveis em sua qualidade e/ou quantidade, depois de colhidos, que os tornam inadequados para o consumo humano (GROLLEAUD, 2002; TYLER; GILMAN, 1979). Sabe-se que tais perdas começam no momento da colheita, mas que também podem ocorrer durante o transporte, o armazenamento e a distribuição, gerando impactos não apenas econômicos, mas também sociais e ambientais (ELIK *et al.*, 2019).

O cenário das perdas pós-colheita é preocupante, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil (FERREIRA, 2017; OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2022b). Dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) de 2019 mostram que na América Latina as perdas e desperdícios de alimentos entre a colheita e o consumo ultrapassam 10% do total produzido. As frutas e os vegetais são um dos grupos de alimentos mais afetados, sendo que mais de 20% do que é produzido é perdido e/ou desperdiçado entre as etapas de colheita, pós-colheita, processamento, distribuição e consumo. (FAO, 2019).

Na prática, as perdas pós-colheita são a consequência de diversos fatores, como, por exemplo, 1) doenças causadas por fungos e bactérias que atacam os frutos e vegetais, 2) desordens fisiológicas, como é o caso da colheita fora do ponto ideal de maturação, e 3) danos físicos que podem ser provocados por insetos ou por

falta de boas práticas de manuseio durante a colheita, o transporte, o armazenamento e a distribuição (KADER; ROLLE, 2004; PANAHIRAD *et al.*, 2021).

Desta forma, se as medidas necessárias para a conservação das frutas e hortaliças não são tomadas durante o período pós-colheita, sua qualidade pode ser comprometida em vários aspectos. Dentre eles, destacam-se a perda de massa por desidratação, perda do valor nutricional, mudanças na cor, no sabor e na textura, e alterações na forma e na aparência dos produtos (PAVLATH; ORTS, 2009). A seguir, são descritas as principais causas das perdas pós-colheitas ao longo da cadeia de produção dos alimentos.

1.1 Perdas na colheita

No Brasil, cerca de 10% de todo o desperdício de alimentos ocorre na etapa inicial da cadeia produtiva, a colheita (HENZ; PORPINO, 2017; ONU VERDE, 2015). Para alimentos como frutas e hortaliças, o estágio de maturação no momento da colheita é o principal fator que determinará sua qualidade, bem como seu tempo de vida de prateleira (FERREIRA, 2017; KADER, 1999). Quando as frutas são colhidas antes de atingirem a maturação, elas se tornam mais suscetíveis a danos mecânicos e apresentam uma baixa qualidade, devido à sua alta acidez e ao seu baixo teor de açúcares. Nesse caso, as frutas perdem tanto seu valor nutricional quanto seu valor econômico (FERREIRA, 2017). Por outro lado, frutas que são colhidas muito maduras apresentam um tempo de vida útil muito curto.

Não apenas o estágio de maturação das frutas na colheita pode gerar perdas, mas também a maneira com que a colheita é feita: o manuseio intensivo ou inadequado leva a uma maior ocorrência de danos físicos nas frutas, os quais aceleram seu metabolismo e reduzem seu tempo de vida de prateleira. O uso de equipamentos com elevada incidência de impactos como colheitadeiras também pode ser prejudicial, levando a perdas significativas (ELIK *et al.*, 2019; FERREIRA; SPRICIGO; SARGENT, 2017).

1.2 Perdas no transporte

Após a colheita, as frutas geralmente são higienizadas, selecionadas e embaladas para transporte, o qual também é um dos principais pontos de perdas pós-colheita, atingindo cerca de 50% no Brasil (ELIK *et al.*, 2019; ONU VERDE, 2015). Além de ser necessário que se mantenha a cadeia de frio durante o

transporte (o que nem sempre ocorre em função da falta de boas práticas no transporte de frutas e hortaliças), operações como a carga e a descarga dos produtos também podem levar a perdas devido aos danos mecânicos que elas acarretam.

O próprio acondicionamento em caixas (Figura 1.1) durante o transporte pode levar a injúrias nas frutas e hortaliças, devido ao empilhamento dos produtos, pressões exercidas sobre sua superfície e choques mecânicos entre os produtos e/ou com superfícies rígidas (ALBUQUERQUE, 2010). Fatores não controláveis como estradas precárias, gestão logística ineficiente, acidentes, chuvas, dentre outros, também contribuem de forma significativa para as perdas nesse período (AZABAĞAOĞLU, 2018).

Figura 1.1. Frutos de mamão com injúrias visíveis acondicionados em caixotes de madeira.



Fonte: adaptado de Albuquerque (2010).

1.3 Perdas no armazenamento

O período de armazenamento entre a colheita e a chegada efetiva das frutas à mesa do consumidor pode variar de algumas horas até alguns meses, dependendo do caso (ELIK *et al.*, 2019). Uma das principais causas de perdas pós-colheita em países em desenvolvimento é a falta de instalações adequadas durante este período (FAO, 2019). No Brasil, essa etapa de armazenamento, especialmente em centrais de abastecimento, é responsável por 30% de todo o desperdício registrado (HENZ; PORPINO, 2017; ONU VERDE, 2015). Assim, o ideal é que as frutas sejam armazenadas em condições apropriadas, que garantam sua chegada ao consumidor seguras para o consumo.

Uma das melhores formas de se alcançar isso é pela aplicação de uma cadeia de frio contínua desde o armazenamento até o transporte e a distribuição. A aplicação da cadeia de frio permite a desaceleração do metabolismo e da respiração das frutas e hortaliças, levando a mudanças metabólicas e estruturais menos intensas e, conseqüentemente, aumentando o tempo de vida de prateleira destes alimentos (ELIK *et al.*, 2019; FERREIRA, 2017). Apesar de ser uma estratégia amplamente utilizada, o uso de baixas temperaturas também pode ser prejudicial: cada produto tem uma tolerância própria em relação à diminuição da temperatura, sendo que alimentos de origem tropical e subtropical, por exemplo, são mais sensíveis ao frio e podem sofrer as chamadas injúrias pelo frio (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Assim, faz-se necessário um controle efetivo e inteligente para cada tipo de fruta e hortaliça durante seu armazenamento.

Outro fator importante a ser considerado durante o armazenamento de frutas e hortaliças é a umidade relativa do ambiente em que estes produtos se encontram. A perda de água dos alimentos pode ser acelerada tanto por altas temperaturas quanto por ambientes com baixa umidade relativa do ar, como é o caso de equipamentos de refrigeração. O monitoramento da relação entre temperatura e umidade relativa do ar é de suma importância, portanto, durante o armazenamento das frutas e hortaliças (FERREIRA, 2017).

1.4 Perdas devido às más práticas de acondicionamento e embalagem

A embalagem dos alimentos frescos é um fator crucial na redução de suas perdas pós-colheita e na extensão de seu tempo de vida de prateleira. Assim, quando conduzida de forma inapropriada ou com materiais impróprios de baixo custo e baixa qualidade, a etapa de embalagem pode levar a sérias perdas (FERREIRA, 2017). Nesses casos, além de não proteger o alimento de danos físicos, a embalagem também pode acelerar sua deterioração e contaminação (ELIK *et al.*, 2019).

Dada a importância das embalagens para a manutenção da qualidade de frutas e hortaliças, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas no sentido de melhorar o desempenho de materiais de embalagens já existentes ou desenvolver novos materiais para embalagens, que desempenhem não apenas a função de acondicionamento do produto, como também funções ativas como a antioxidante e antimicrobiana, para a extensão do tempo de vida de prateleira do alimento

acondicionado. Neste sentido, vem crescendo o desenvolvimento de técnicas como a nanotecnologia (e a aplicação de materiais na escala nanométrica, como as nanopartículas inorgânicas) e o uso de materiais poliméricos naturais e de revestimentos comestíveis (FERREIRA, 2017), conforme será abordado na seção 3.

1.5 Desperdício no varejo e no momento do consumo

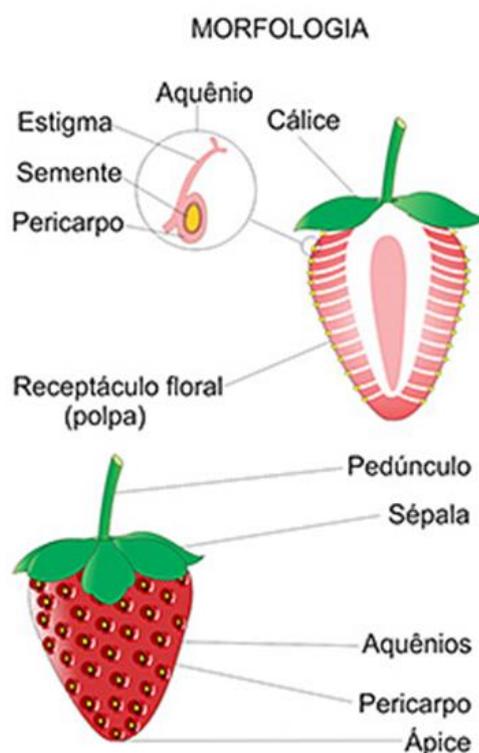
As más práticas durante o transporte e o armazenamento podem resultar também em desperdícios nas lojas e distribuidoras de alimentos, devido à diminuição em seu tempo de vida útil e/ou comercializável. Outro fator que contribui para o desperdício no varejo é a “cultura do embelezamento” dos produtos, os quais devem apresentar características estéticas atrativas como forma, cor e tamanho para serem comercializados (HENZ; PORPINO, 2017).

Apesar de não ser considerada uma etapa das perdas pós-colheita, a fase de consumo também pode ser analisada para que o cenário de perdas e desperdícios de alimentos ao longo de sua cadeia produtiva se complete. Desperdícios consideráveis de alimentos frescos ocorrem também na fase de consumo, a qual se estende desde o momento da compra pelos consumidores até o momento efetivo do consumo. No Brasil, cerca de 10% de todos os alimentos produzidos são desperdiçados nos supermercados e pelos consumidores (ONU VERDE, 2015). As principais causas desse elevado desperdício estão relacionadas ao excesso de compras, à má gestão do que foi comprado e à falta de planejamento por parte dos consumidores (ELIK *et al.*, 2019). Enquanto os demais itens discutidos acima (colheita, acondicionamento, transporte, armazenamento e distribuição) são mais críticos em países em desenvolvimento, o desperdício por parte dos consumidores é mais acentuado em países desenvolvidos (FERREIRA, 2017).

2. MORANGOS

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) é uma planta rasteira da família das rosáceas, híbrida de duas espécies originárias das Américas, a *F. chiloensis* e a *F. virginiana*. Uma curiosidade sobre o morango é que os verdadeiros frutos do morangueiro são os aquênios, ou seja, os pontos pretos presentes na epiderme vermelha do morango (Figura 1.2). O morango, que é o fruto comestível, na realidade é o receptáculo hipertrofiado da flor do morangueiro (ANTUNES, 2011).

Figura 1.2. Morfologia do morango.



Fonte: adaptado de <https://ceagesp.gov.br/hortiescolha/hortipedia/morango/>. Acesso em: 17 out. 2023.

O Brasil é o maior produtor de morangos da América do Sul, com cerca de 165.000 toneladas de frutos produzidas anualmente, o que corresponde a aproximadamente 4.500 hectares destinados ao seu cultivo. Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo são os quatro maiores produtores de morangos, com uma produtividade anual maior que 30 toneladas/hectare (produtividade média brasileira). O preço médio do quilo de morango no Brasil pode variar de R\$ 4,00 a R\$ 18,00, dependendo da região e da época do ano. De forma geral, os preços aumentam entre fevereiro e maio (período de entressafra), mês no qual os estados das regiões Sul e Sudeste chegam a pagar mais de R\$ 12,00/quilo (ANTUNES; BONOW; REISSER JUNIOR, 2020).

Apesar de ser um dos produtos mais caros do mercado de hortigranjeiro brasileiro (CEASA, 2023), o morango é um dos frutos mais populares no país. Além do fruto apresentar características sensoriais atrativas, o consumo de morango também traz benefícios nutricionais devido aos seus altos níveis de vitamina C (63,6 mg 100 g⁻¹) e de minerais como o cálcio (11 mg 100 g⁻¹) e o magnésio (10 mg 100 g⁻¹) (LIU *et al.*, 2017; TACO, 2011). Mesmo sendo frutos não

climatéricos, os morangos apresentam uma alta taxa de respiração celular e sua maturação é afetada pela presença do fito hormônio etileno (TOSETTI *et al.*, 2020).

Esses altos níveis respiratórios, aliados à sua textura macia (muito sensível a choques mecânicos) e à sua alta sensibilidade à temperatura, fazem com que os morangos sejam frutos altamente perecíveis, com um tempo de vida útil curto (BARIKLOO; AHMADI, 2018). À temperatura ambiente (acima de 20 °C), os morangos apresentam um tempo de vida de prateleira médio de apenas 2 dias (NASCIMENTO, 2008). Mesmo quando armazenados em temperatura de refrigeração (abaixo de 10 °C), o tempo de vida de prateleira médio dos morangos é de cerca de 7 dias (IKEGAYA *et al.*, 2020). Além disso, sua elevada atividade de água ($a_w \geq 0,98$) e seu pH entre 3,0 e 3,9 são fatores que propiciam o desenvolvimento de microrganismos como os bolores, que contribuem para a rápida deterioração microbiológica dos frutos (GIL-GIRALDO; DUQUE-CIFUENTES; QUINTERO-CASTAÑO, 2018).

Duas das principais doenças causadas por fungos nos morangos são o mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) e a podridão de rizópus (*Rhizopus stolonifer*), ambas muito incidentes no período pós-colheita. O *B. cinerea* pode afetar os frutos no campo ou durante seu transporte, armazenamento e comercialização. Esse fungo tem uma fase de infecção quiescente nos morangos, o que significa que frutos aparentemente sadios na colheita podem desenvolver a podridão no período pós-colheita (REIS; COSTA, 2011). Os frutos contaminados com o *B. cinerea* se tornam amolecidos e desenvolvem uma massa cinzenta em sua superfície, sendo essa doença a causa mais comum da rejeição dos morangos por parte dos produtores, transportadores e consumidores (PETRASCH *et al.*, 2019). O *R. stolonifer*, por sua vez, ataca lesões existentes nas superfícies dos morangos e sua esporulação se dá de forma rápida, podendo também contaminar injúrias e lesões em outros frutos por contato direto entre o fruto sadio e o contaminado (NUNES *et al.*, 2005).

Assim, apesar do Brasil ser o maior produtor de morangos da América do Sul, as perdas pós-colheita associadas a esses frutos causam muitos prejuízos econômicos, sociais e ambientais. Nos mercados brasileiros, o morango é o terceiro item da lista de maiores perdas em valor de frutas, legumes e verduras, atrás apenas do tomate e da batata (ABRAS, 2021). Destaca-se, dessa forma, a importância do desenvolvimento de novas tecnologias de conservação de morangos

para a extensão do seu tempo de vida de prateleira, garantindo não apenas menos perdas, mas também uma maior segurança alimentar para o consumidor.

3. USO DE REVESTIMENTOS POLIMÉRICOS NATURAIS PARA O RECOBRIMENTO DE FRUTAS

Uma das melhores formas de se estender o tempo de vida de prateleira dos vegetais é pela diminuição da sua taxa respiratória com a consequente desaceleração do seu metabolismo (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2022b). Conforme mencionado na seção 1.3, uma das técnicas mais aplicadas para se alcançar esse objetivo é a refrigeração dos alimentos. Entretanto, cada produto vegetal possui uma temperatura ideal para sua conservação. Se bananas e maçãs forem armazenadas em um refrigerador doméstico, por exemplo, após alguns dias as maçãs ainda estarão viáveis para consumo, enquanto as bananas apresentarão dano pelo frio (do inglês, *chilling injury*), facilmente visualizado pelo escurecimento da sua casca (HERPPICH; ZSOM, 2021).

Tal injúria ocorre provavelmente devido à transição da membrana celular lipídica de alguns frutos para uma fase de gel em temperaturas críticas, o que altera sua permeabilidade e resulta em vazamento do conteúdo celular e perda da compartimentação (PARKIN *et al.*, 1989). Diante do exposto, a necessidade de um controle efetivo da temperatura para cada tipo de alimento durante o armazenamento pós-colheita acaba sendo uma prática de elevado custo (ELIK *et al.*, 2019; FERREIRA, 2017).

Outra tecnologia de conservação pós-colheita que também apresenta um alto custo de operação são as chamadas câmaras de atmosferas controladas e/ou modificadas (LUVIELMO; LAMAS, 2012). Nessas câmaras de armazenamento, a entrada e saída de gases é controlada e pode ser associada ao uso de refrigeração para a conservação das frutas (PANAHIRAD *et al.*, 2021). Nas câmaras modificadas, as concentrações dos gases oxigênio, gás carbônico e nitrogênio são diferentes das encontradas para esses gases na composição do ar (21, 0,03 e 78%, respectivamente) (SANTOS *et al.*, 2011).

Assim, apesar de bem estabelecidas, as tecnologias acima mencionadas apresentam altos custos de operação, e podem ser associadas a outros processos

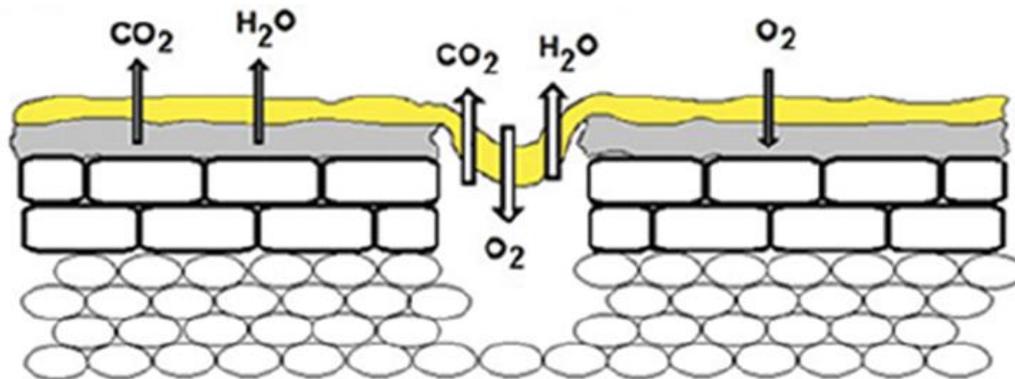
para uma melhor conservação das frutas em seu período pós-colheita. Nesse sentido, novas tecnologias de conservação de alimentos vêm sendo desenvolvidas e testadas, inspiradas pelos Objetivos para o Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU). Os ODS compõem a chamada “Agenda 2030”, um plano que reúne 17 diferentes temas que têm impacto direto ou indireto sobre o desenvolvimento sustentável ao redor do mundo (ONU, 2022).

Mais especificamente, o ODS de número 12 é intitulado “Consumo e Produção Responsáveis” e está diretamente comprometido com a temática de perda e desperdício de alimentos (ONU, 2022). Em particular, o item 12.3 do ODS 12 prevê: *“Até 2030, reduzir pela metade o desperdício de alimentos per capita mundial, nos níveis de varejo e do consumidor, e reduzir as perdas de alimentos ao longo das cadeias de produção e abastecimento, incluindo as perdas pós-colheita”*.

Assim, pode-se inserir no item 12.3 o desenvolvimento de revestimentos comestíveis como uma tecnologia nova e de baixo custo para a conservação dos alimentos em seu período pós-colheita. Por definição, os revestimentos comestíveis são membranas ou películas formadas por biopolímeros como polissacarídeos, proteínas e lipídeos, que podem ser aplicadas ou diretamente formadas sobre a superfície das frutas (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2022b; VARGAS *et al.*, 2008).

Os revestimentos atuam como uma barreira semipermeável, preenchendo parcialmente os estômatos e lenticelas dos alimentos, reduzindo as taxas de transpiração (transferência de umidade) e de respiração (trocas gasosas) (ASSIS; BRITTO, 2017) (Figura 1.3). Assim, além de desacelerar o metabolismo das frutas (pela diminuição da respiração celular dos tecidos), os revestimentos também as protegem do ganho ou da perda excessivos de água, auxiliando na manutenção de sua textura e elevando seu tempo de conservação. Os revestimentos também podem proteger as frutas da exposição à luz UV e atuar como agentes antioxidantes e antimicrobianos, salvaguardando os alimentos de processos oxidativos e do ataque de microrganismos deteriorantes (SILVA-WEISS *et al.*, 2013).

Figura 1.3. Representação da ação de um revestimento sobre os estômatos e lenticelas dos frutos, formando uma barreira semipermeável à passagem de gases e água.



Fonte: adaptado de Assis e Britto (2017).

Uma vez que a película polimérica é formada sobre a superfície do alimento, o revestimento comestível passa a ser parte integrante dele. Assim, os materiais utilizados para a formulação desses revestimentos devem seguir todas as regulações que são pertinentes a ingredientes alimentares, de forma a se manter não apenas a qualidade do alimento revestido, mas também a segurança do consumidor. Os polímeros empregados devem ser considerados *GRAS*, do inglês *Generally Recognized as Safe*, ou seja, reconhecidos como seguros para consumo (NAYAK *et al.*, 2019).

Além disso, a escolha dos polímeros de revestimento também depende das características do produto a ser revestido e dos principais objetivos almejados com o seu revestimento. Fatores como custo e disponibilidade, propriedades mecânicas como flexibilidade, propriedades ópticas como brilho, transparência e opacidade, e propriedades de barreira a gases e ao vapor d'água são de extrema importância para a escolha do polímero (FALGUERA *et al.*, 2011; PAUL; PANDEY, 2014). A Tabela 1.1 apresenta um levantamento de alguns dos polímeros mais empregados como revestimentos comestíveis em frutas e hortaliças e as principais vantagens e desvantagens do uso de cada um deles em alimentos (ASSIS; BRITTO, 2014).

Tabela 1.1. Principais polímeros empregados em materiais de revestimento e as vantagens e desvantagens do seu uso no recobrimento de alimentos.

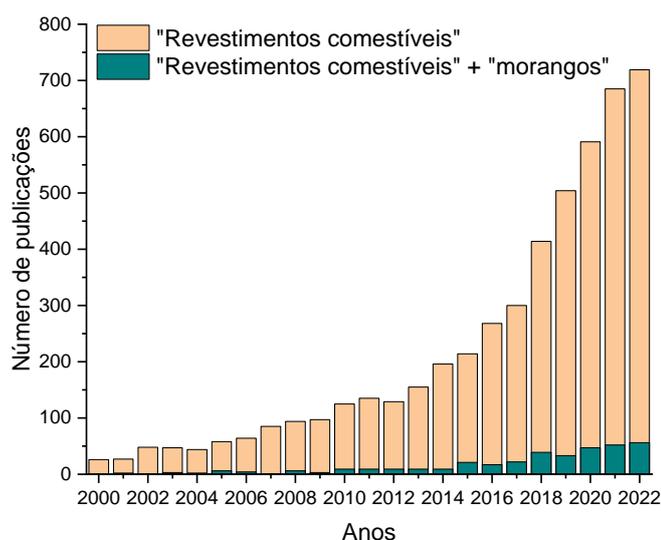
Polímero de revestimento	Vantagens e desvantagens	Referências
Alginato	Mantém a cor, reduz a taxa de respiração e a perda de água, mas possui baixa atividade antimicrobiana	PARREIDT; MÜLLER; SCHMID, 2018
Amido	Mantém a cor e a firmeza, diminui a perda de água, mas possui baixa atividade antimicrobiana	LUCIANO; CHALCON; VALENCIA, 2022
Cera de carnaúba	Reduz a perda de água e a deterioração visual e mantém a firmeza, mas aumenta o brilho superficial	OLIVEIRA FILHO <i>et al.</i> , 2022c
Gelatina	Reduz a perda de água e a passagem de vapor d'água, mas é sensível à temperatura e apresenta baixa atividade antimicrobiana	LU <i>et al.</i> , 2022
Goma xantana	Mantém a cor, reduz o escurecimento e apresenta atividade antimicrobiana, mas é sensível à temperatura	CORTEZ-VEGA <i>et al.</i> , 2013
Hidroxipropilmetilcelulose	Reduz a taxa de respiração e a perda de água, mas aumenta o brilho superficial	SILVA, 2018
Pectina	Mantém a firmeza e a cor, não reduz a perda de água	ROHASMIZAH; AZIZAH, 2022
Quitosana	Reduz a respiração e a perda de água, tem atividade antimicrobiana e antifúngica e mantém a cor, mas é solúvel apenas em pH ácido	SHIEKH <i>et al.</i> , 2013

Fonte: autoria própria.

De acordo com o observado na Tabela 1.1, cada biopolímero de revestimento possui características específicas que levarão a efeitos distintos nas coberturas por eles formadas (JAFARZADEH *et al.*, 2021). Portanto, faz-se necessário caracterizar quimicamente os revestimentos como uma etapa preliminar à sua aplicação no fruto, com a avaliação de suas propriedades reológicas, morfológicas, espectroscópicas, relacionadas à água, ópticas, mecânicas, dentre outras. Da mesma forma, faz-se necessário um conjunto de técnicas de caracterização físico-químicas para a avaliação da qualidade e da extensão da vida de prateleira dos frutos após o recobrimento, como mudanças em sua cor e textura, em seu pH, na sua perda de massa, na sua taxa de respiração, em seus teores de compostos bioativos, bem como em seu perfil de compostos voláteis (relacionados ao aroma e sabor) ao longo dos dias de armazenamento. Por fim, uma avaliação sensorial do alimento após ser recoberto pelo revestimento desenvolvido também é de extrema importância para se avaliar a resposta de provadores frente ao novo fruto revestido.

Como são muitos os aspectos a serem avaliados e estudados para o desenvolvimento de revestimentos poliméricos naturais, o número de estudos publicados sobre o tema vem apresentando uma tendência de crescimento ao longo dos últimos anos. A Figura 1.4 mostra um levantamento feito na base de dados do *Web of Science* dos artigos publicados desde o ano de 2000 utilizando os termos “revestimentos comestíveis” como tópico (ou seja, podendo estar presente no título, resumo ou palavras-chave do artigo). Um crescimento expressivo e exponencial no número de artigos publicados anualmente pode ser observado na última década, indo de cerca de 200 artigos em 2014 para mais de 700 artigos no ano de 2022. Tal tendência de crescimento nas publicações pode ser um reflexo da maior importância que vem sendo dada ao tema atualmente.

Figura 1.4. Número de artigos publicados (2000-2022) com os termos “revestimentos comestíveis” e “revestimentos comestíveis” + “morangos” como tópicos (título, resumo ou palavras-chave).



Fonte: autoria própria. Números obtidos da base de dados do *Web of Science* em junho/2023.

Quando se inclui na busca a palavra “morangos”, o número de artigos passa a ser bem menor, mas a tendência de crescimento se mantém ao longo dos últimos 5 anos. Em 2022, foram publicados 56 artigos relacionados ao uso de revestimentos comestíveis para morangos. A Tabela 1.2 mostra alguns dos artigos mais recentes que publicaram pesquisas sobre o desenvolvimento de revestimentos poliméricos naturais com diferentes materiais e sua aplicação em morangos, bem como os principais resultados decorrentes do recobrimento.

Tabela 1.2. Revestimentos comestíveis à base de diferentes polímeros e seus efeitos como recobrimentos de morangos.

Material de revestimento	Efeitos	Referência
Amido de milho/ óleo essencial de louro	Redução na perda de massa e na taxa de respiração dos frutos. Prevenção na severidade de doenças e contaminação fúngicas.	KAHRAMANOĞLU <i>et al.</i> , 2022
Carboximetil celulose/óleo de semente de romã	Redução em 35% na perda de massa dos frutos após 16 dias de armazenamento e preservação em cerca de 70% do conteúdo de fenólicos totais dos morangos	MELIKOĞLU <i>et al.</i> , 2022
Caseinato de sódio/goma guar/cera de abelha	Redução em 17% na respiração e em 40% na transpiração dos frutos.	MIELE <i>et al.</i> , 2022
Quitosana/óleos essenciais de <i>Hippophae</i> e semente de uva	Redução no conteúdo de fungos e leveduras dos frutos ao longo do armazenamento. Redução nos valores de atividade de água.	POPESCU <i>et al.</i> , 2022
Amido de milho/ suco de uva	Preservação do conteúdo total de fenólicos, do teor de antocianinas, do conteúdo de vitamina C e da atividade antioxidante dos frutos revestidos. Por outro lado, os frutos revestidos apresentaram menor aceitação sensorial.	YILDIRIM-YALÇIN; ŞEKER; SADIKOĞLU, 2022

Fonte: autoria própria.

Diante do que foi exposto sobre a problemática de perdas pós-colheita de morangos e de como o uso de revestimentos poliméricos naturais pode ser uma alternativa para a melhoria da qualidade dos frutos e extensão do seu tempo de vida de prateleira, esta pesquisa teve por objetivo o desenvolvimento de revestimentos à base de dois polímeros naturais, a quitosana e a gelatina, incorporados com extratos fenólicos de cascas de romã. Tais polímeros foram escolhidos por apresentarem características atrativas para o uso como revestimentos, tais como a não toxicidade, capacidade de formação de filmes, e o fato de serem seguros para consumo. A seguir, as características e os usos destes dois polímeros serão abordados, bem como os objetivos da incorporação dos extratos fenólicos.

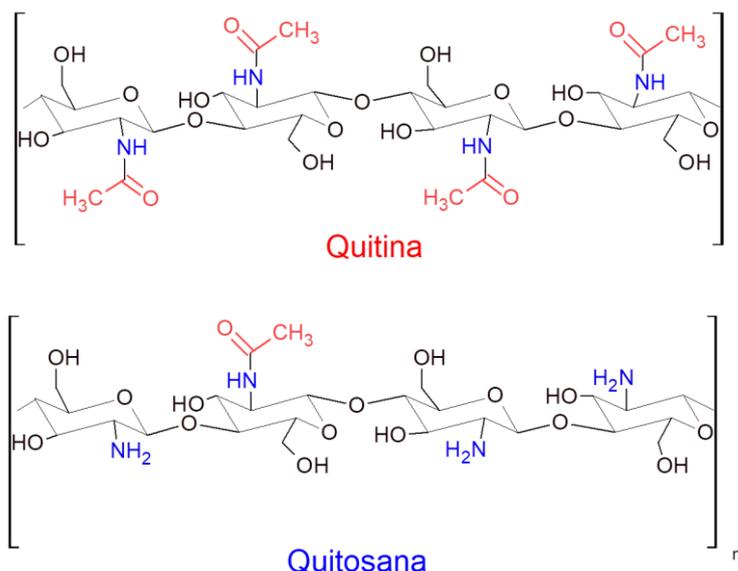
3.1 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo proveniente da desacetilação da quitina, o segundo biopolímero renovável mais abundante na natureza. A quitina pode ser encontrada no exoesqueleto de crustáceos, na parede celular de certos fungos, cogumelos, artrópodes, nematoides, insetos e na estrutura de moluscos (AZEVEDO

et al., 2007). As principais fontes de quitina são os resíduos da indústria da pesca, como as carcaças de camarões, caranguejos, lulas e lagostas. A extração da quitina desses materiais pode ser considerada, portanto, uma forma de se reaproveitar os resíduos para agregação de valor comercial aos mesmos (ADILETTA; MATTEO; PETRICCIONE, 2021).

Estruturalmente, a quitosana e a quitina são polissacarídeos lineares constituídos por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicose e 2-amino-2-deoxi-D-glicose (Figura 1.5), que se unem por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4), diferindo pela porção relativa destas unidades (AZEVEDO *et al.*, 2007). A presença dos grupos amino ($-\text{NH}_2$) na estrutura da quitosana faz com que a carga e a solubilidade dos dois polissacarídeos sejam distintas. A quitosana é solúvel em soluções diluídas de ácidos e apresenta cargas positivas devido à protonação desses grupos amino, já a quitina é insolúvel na maioria dos solventes testados devido à predominância de grupos acetamida ($-\text{NHCOCH}_3$) em sua estrutura (ADILETTA; MATTEO; PETRICCIONE, 2021).

Figura 1.5. Estruturas químicas da quitina e da quitosana.

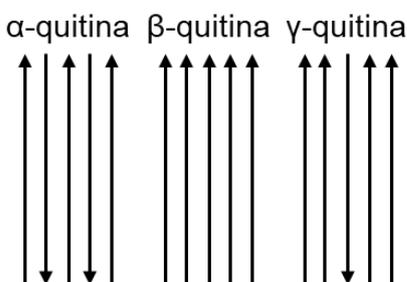


Fonte: autoria própria.

De acordo com a fonte de obtenção, a quitina pode assumir três estruturas polimórficas (α -, β - e γ -quitina), as quais se diferem pela orientação das cadeias poliméricas e afetam as propriedades da quitosana obtida após o processo de desacetilação (CAMPANA FILHO *et al.*, 2007). A α -quitina é a forma mais abundante

e estável, sendo encontrada em estruturas mais rígidas, como exoesqueletos de insetos. Nessa estrutura, as cadeias são dispostas de forma antiparalela, em diferentes lamelas, o que facilita a formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias (Figura 1.6). Já na β -quitina, encontrada em fontes menos rígidas como as estruturas de moluscos, as cadeias estão orientadas paralelas umas às outras. Isso dificulta a formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias, mas aumenta a reatividade da quitosana devido à maior disponibilidade dos grupos amino. A γ -quitina, por fim, apresenta uma combinação dos dois arranjos anteriores e é também encontrada em fontes menos rígidas, como larvas, casulos de insetos, e fungos (CAMPANA FILHO *et al.*, 2007).

Figura 1.6. Representação esquemática das diferentes estruturas polimórficas da quitina.



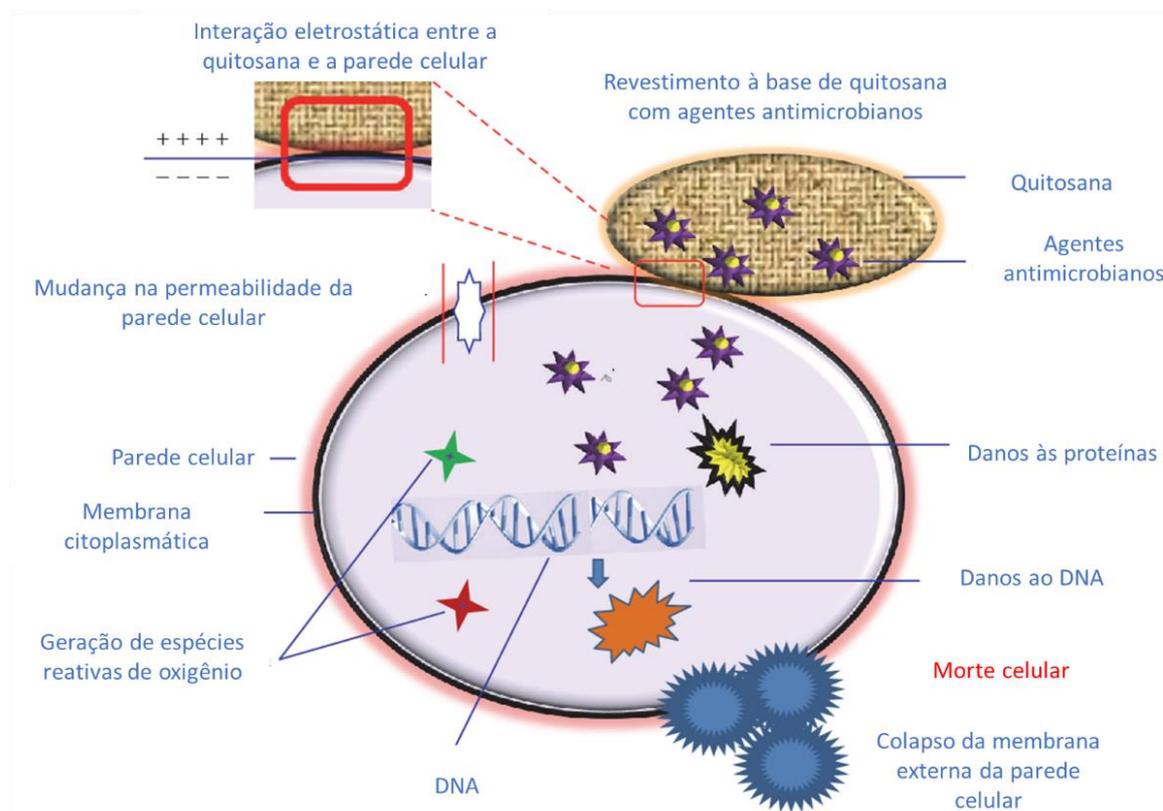
Fonte: autoria própria. Adaptado de Campana Filho *et al.* (2007).

Além da estrutura polimórfica da quitina, o grau de acetilação, definido como a porcentagem de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose, também é uma das propriedades fundamentais na caracterização da quitosana, pois tem influência direta em suas propriedades físico-químicas. Outro parâmetro importante é a massa molar da quitosana, a qual também terá influência sobre as propriedades dos materiais formados por esse polímero (ADILETTA; MATTEO; PETRICCIONE, 2021).

Tanto o grau de acetilação quanto a massa molar da quitosana estão relacionados à sua atividade antimicrobiana intrínseca, a qual é devida à presença, densidade e localização das cargas catiônicas na cadeia polimérica. O mecanismo mais sugerido para a atividade antimicrobiana da quitosana contra diversas bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos e leveduras é o de interação eletrostática entre o polímero e a membrana destes microrganismos. Segundo esse mecanismo, os grupos amino protonados da quitosana, em meio ácido, interagem com os grupos aniônicos carboxílicos e fosfatos das membranas celulares dos microrganismos. Essa interação altera a permeabilidade da membrana celular, reduz

a troca de gases entre o interior da célula e o ambiente e leva à ruptura da membrana e ao extravasamento do conteúdo celular (SAHARIAH; MÁSSON, 2017) (Figura 1.7).

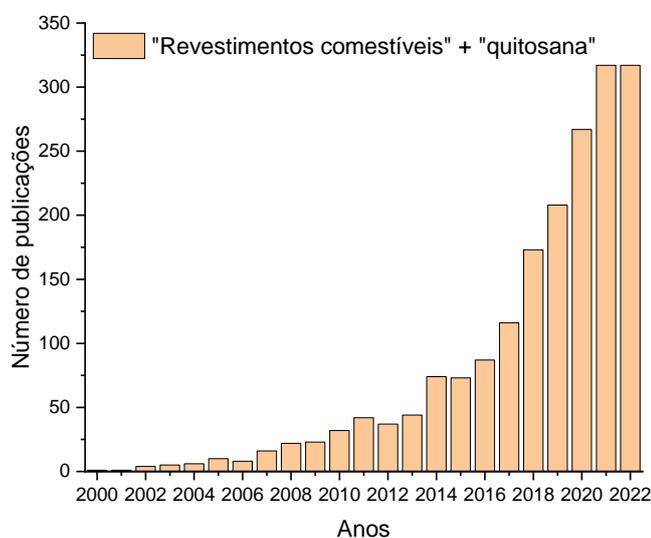
Figura 1.7. Mecanismo proposto para a atividade antimicrobiana da quitosana.



Fonte: adaptado de Xing *et al.* (2016).

Devido à sua atoxicidade frente à saúde humana, biocompatibilidade, capacidade filmogênica e biodegradabilidade, bem como à atividade antimicrobiana explicada acima, a quitosana é considerada um biopolímero ideal para a produção de materiais para revestimentos de alimentos (ADILETTA; MATTEO; PETRICCIONE, 2021; CHEN *et al.*, 2022). A Figura 1.8 mostra o número de artigos publicados desde 2000 utilizando os termos “revestimentos comestíveis” + “quitosana” como palavras-chave. Nos últimos 5 anos (2017-2022) o número de publicações sobre o tema mais do que dobrou, alcançando mais de 300 artigos publicados anualmente.

Figura 1.8. Número de artigos publicados (2000-2022) com os termos “revestimentos comestíveis” + “quitosana” como tópicos (título, resumo ou palavras-chave).



Fonte: autoria própria. Números obtidos da base de dados do *Web of Science* em junho/2023.

Os filmes e revestimentos de quitosana apresentam boa permeabilidade seletiva à passagem de oxigênio e gás carbônico, mas a alta permeabilidade ao vapor d'água limita suas aplicações em revestimentos de alimentos. Assim, muitos estudos têm sido conduzidos no sentido de melhorar as propriedades funcionais dos filmes de quitosana e suas propriedades de barreira, combinando-a com outros compostos naturais, como proteínas ou outros polissacarídeos (AZAZA *et al.*, 2022; NOWZARI; SHÁBANPOUR; OJAGH, 2013).

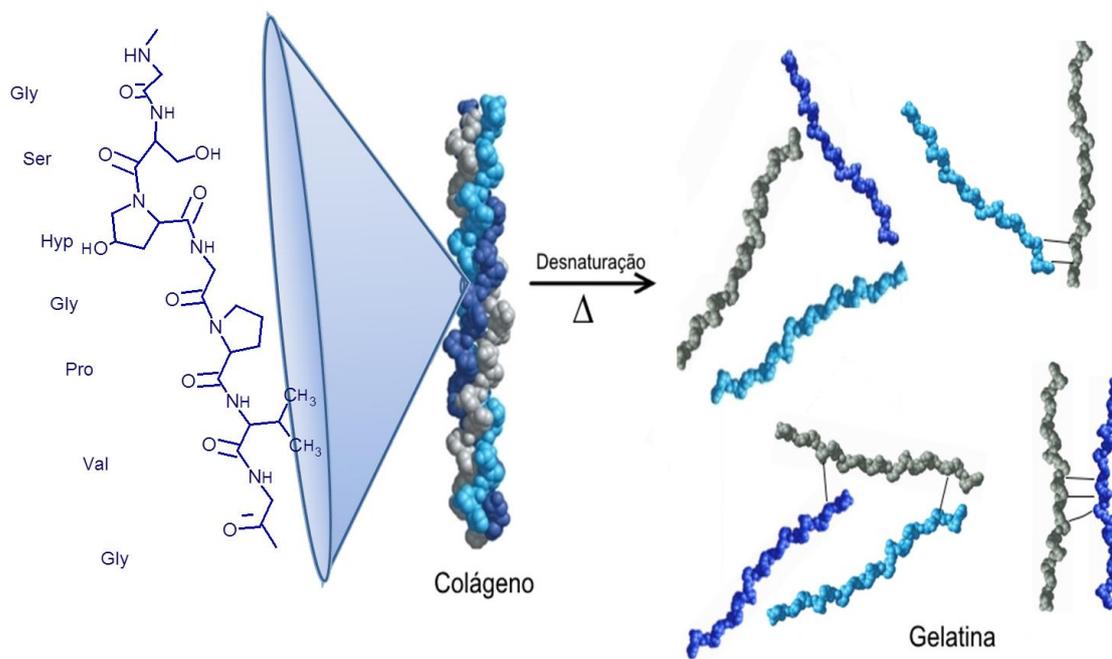
3.2 Gelatina

A gelatina é uma proteína purificada derivada do colágeno presente nos ossos, pele e tendões dos animais (WANG; QIAN; DING, 2018). Dependendo da fonte do colágeno e do método de obtenção, a gelatina pode apresentar propriedades físico-químicas diversas, com uma massa molar variando entre 100 e 1000 kDa. A gelatina é obtida a partir do colágeno do tipo I (o qual não tem resíduos do aminoácido cisteína) por processos de hidrólise parcial que envolvem a destruição das estruturas terciária, secundária e, em alguma extensão, primária do colágeno nativo (MARIOD; ADAM, 2013).

Dependendo do tipo de tratamento ao qual o colágeno é submetido durante a hidrólise, a gelatina pode ser classificada como sendo do tipo A (hidrólise ácida) ou tipo B (hidrólise alcalina). Sua estrutura é composta por tríades de aminoácidos

essenciais (com exceção do triptofano) terminadas em glicina (Figura 1.9). A tríade de aminoácidos mais comum encontrada na gelatina é a de hidroxiprolina, prolina e glicina (THEIN-HAN *et al.*, 2009).

Figura 1.9. Estrutura química do colágeno e representação da obtenção da gelatina.



Fonte: autoria própria.

A gelatina é um hidrocoloide e forma géis durante o resfriamento de soluções previamente aquecidas. Durante o resfriamento, a rede peptídica que foi rompida na hidrólise do colágeno sofre uma reordenação, formando uma rede tridimensional altamente ramificada, capaz de armazenar e imobilizar a água no seu interior. O sólido fluido é então convertido em um “sólido elástico”, ou seja, em um gel (DJAGNY; WANG; XU, 2001). Essa propriedade torna a gelatina uma proteína versátil para ser utilizada como agente emulsificante, estabilizante e espessante. Fatores como sua atoxicidade, biodegradabilidade e segurança para consumo também fazem com que a gelatina seja aplicada em diversas áreas como, por exemplo, alimentos, farmacêutica, médica, dentre outras.

Materiais à base de quitosana e gelatina formam complexos poli eletrolíticos com facilidade e boa miscibilidade pela interação entre os grupos carboxílicos livres provenientes dos aminoácidos da gelatina e dos grupos amino protonados da quitosana. Esses materiais têm mostrado melhorias nas propriedades mecânicas e nas propriedades de barreira ao vapor d'água e à passagem de luz quando

comparados a filmes contendo apenas quitosana, o que possibilita e impulsiona seu uso como revestimentos de alimentos (BERTOLO *et al.*, 2022).

4. INCORPORAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PROVENIENTES DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NOS REVESTIMENTOS

Embora a combinação de quitosana e gelatina apresente propriedades adequadas que garantem um material polimérico com boas características para aplicação como revestimento de alimentos, suas propriedades ativas podem ser aprimoradas pela incorporação de composto fenólicos. Assim, o desenvolvimento de revestimentos poliméricos ativos combinados com extratos de plantas está na vanguarda da pesquisa de embalagens e revestimentos de alimentos (BERTOLO *et al.*, 2022).

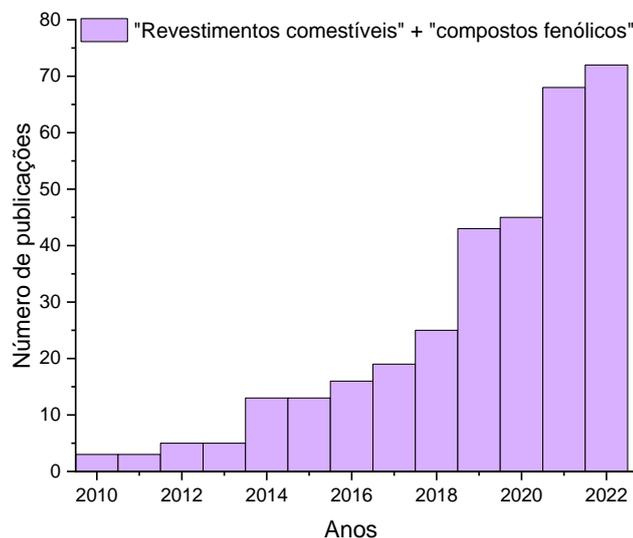
Extratos vegetais são, por definição, “extratos de plantas que contêm fibras, vitaminas, minerais e outras substâncias naturais com propriedades antioxidantes, hipoglicemiantes e antiproliferativas” (NCI *Drug Dictionary*). Concentrados de moléculas biologicamente ativas, com propriedades nutracêuticas e farmacêuticas, esses extratos vêm sendo usados como ingredientes e suplementos alimentares e funcionais. Os compostos majoritários desses extratos, muitas vezes, são os compostos fenólicos, metabólitos secundários vegetais conhecidos por seus efeitos benéficos para a saúde humana, como a prevenção do câncer e de doenças cardiovasculares (CAO *et al.*, 2021).

Quimicamente, os compostos fenólicos vão desde moléculas simples como ácidos fenólicos e flavonoides até compostos altamente polimerizados como taninos e ligninas (VIUDA-MARTOS; FERNÁNDEZ-LOPEZ; PÉREZ-ÁLVAREZ, 2010). Uma das principais propriedades dos compostos fenólicos é sua elevada atividade antioxidante, isto é, sua capacidade de sequestro de radicais livres. Devido às suas estruturas benzênicas, essas moléculas possuem um sistema ressonante capaz de estabilizar radicais livres e inibir o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica em células e tecidos, de modo a retardar ou evitar doenças degenerativas e de senescência de alimentos (CAO *et al.*, 2021).

A Figura 1.10 mostra o número de artigos publicados desde 2010 contendo os termos “revestimentos comestíveis” + “compostos fenólicos” como tópicos. Por ser

um tema muito recente, o número de artigos apresentou um aumento significativo nos últimos dois anos, ultrapassando a marca de 70 publicações anuais.

Figura 1.10. Número de artigos publicados (2010-2022) com os termos “revestimentos comestíveis” + “compostos fenólicos” como tópicos (título, resumo ou palavras-chave).



Fonte: autoria própria. Números obtidos da base de dados do *Web of Science* em junho/2023.

Os compostos fenólicos a serem incorporados nos revestimentos poliméricos podem ser obtidos através de fontes vegetais consideradas oriundas de resíduos agroindustriais. Materiais como folhas, cascas, sementes, grãos e bagaço, por não serem consumidos, geralmente são descartados pela indústria alimentícia, sendo destinados, na grande maioria das vezes, para aplicações sem grande valor agregado, como na alimentação animal. Entretanto, esses subprodutos costumam ser ricas fontes de compostos fenólicos. Dessa forma, a recuperação de compostos fenólicos com um alto valor agregado a partir de resíduos agroindustriais pode ser inserida nos conceitos de economia circular, de modo a se prevenir o desperdício de alimentos (no caso, os frutos que serão recobertos pelos revestimentos contendo os fenólicos) ao se reutilizar estes subprodutos da indústria alimentícia (OTONI *et al.*, 2021; VARGHESE *et al.*, 2023).

4.1 Extrato de casca de romã

A romã, *Punica granatum* L., é uma fruta pertencente à família *Punicaceae* cujo consumo data de milhares de anos (VIUDA-MARTOS; FERNÁNDEZ-LOPEZ; PÉREZ-ÁLVAREZ, 2010). O fruto da romã pode ter até 12 cm de diâmetro, sendo composto por uma casca de coloração vermelha ou amarela e por muitas sementes,

envoltas em estruturas denominada de arilos, isto é, membranas que contêm em seu interior um suco vermelho. Os arilos são ainda separados por um pericarpo branco e membranoso (MOHAMMAD; KASHANI, 2012) (Figura 1.11).

Figura 1.11. Frutos da romã.



Fonte: adaptado de <https://www.herzindagi.com/diet-nutrition/pomegranate-recipes-benefits-article-221381>. Acesso em: 04 jul. 2023.

O cultivo da romã é bem amplo, abrangendo países como Irã, Índia, países do Mediterrâneo e do sudeste da Ásia, Malásia, África tropical, Estados Unidos (em especial Califórnia e Arizona), bem como a China, o Japão e a Rússia. A romã foi trazida ao Brasil pelos portugueses e se acimatou de forma dispersa por todo o território brasileiro. Em 2017 foram produzidas cerca de 279 toneladas de romã no Brasil, sendo Pernambuco o maior produtor dentre os estados brasileiros (IBGE).

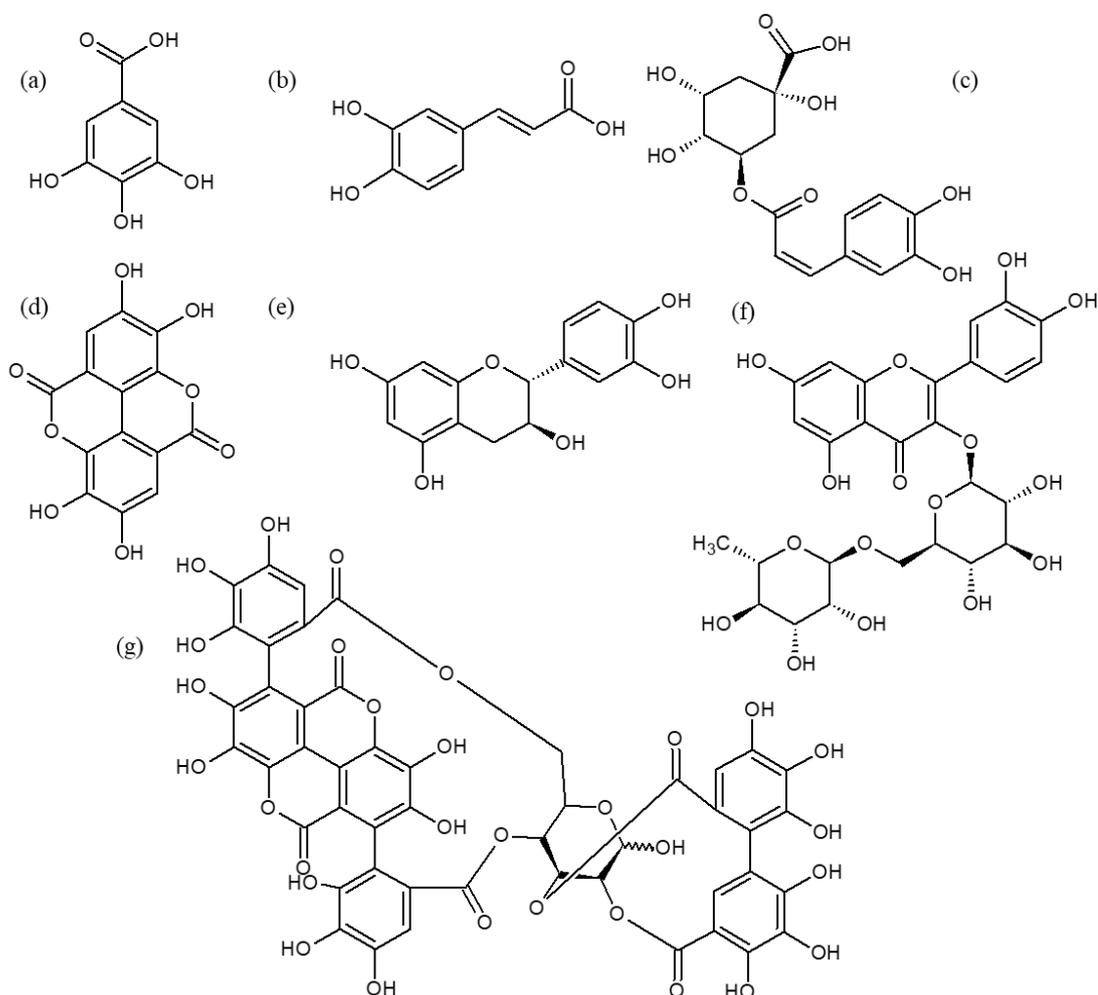
A romã é muito conhecida por suas propriedades nutricionais e medicinais. Dentre elas, encontram-se o tratamento e a prevenção contra células cancerígenas da próstata, da mama e do cólon, contra doenças cardiovasculares, diabetes, úlcera e proteção contra radiação ultravioleta (FAROOQI, 2021). No que diz respeito às propriedades antimicrobianas, os extratos de romã são capazes de inibir o crescimento de microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, de bactérias cariogênicas, além de apresentarem atividade antiviral contra o vírus da Influenza A H3N2 (ENDO *et al.*, 2012; PAGLIARULO *et al.*, 2016).

Todas estas propriedades da romã estão relacionadas a um considerável número de compostos ativos como fenólicos e flavonoides, que também estão

presentes em partes não comestíveis da fruta, como a casca (Figura 1.12). Por isso, observa-se um crescente interesse na produção de extratos da mesma (NAIR; SAXENA; KAUR, 2018). A casca da romã representa cerca de 60% do peso total da fruta e atualmente não existe nenhuma reutilização de valor agregado para ela, sendo por isso considerada um resíduo agroindustrial (AKHTAR *et al.*, 2015). Dados de 2020 apontam que, das 3 milhões de toneladas de romãs produzidas anualmente, cerca de 1,62 milhões de resíduos são gerados, sendo a maior parte composta pela casca (MAGANGANA *et al.*, 2020).

Dessa forma, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos no sentido de agregar valor à casca da romã, utilizando seus extratos para a preservação de alimentos, como aditivos alimentares, ou como matéria-prima para o desenvolvimento de alimentos funcionais (XIANG *et al.*, 2022). Givi, Gholami e Massah (2019), por exemplo, utilizaram extrato de casca de romã como um conservante para o controle da podridão pós-colheita causada por *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum* em tangerinas. Os autores relataram que soluções de 75-100% de extrato reduziram as porcentagens de infecção nos frutos, bem como aumentaram os teores de fenólicos e flavonoides totais das tangerinas. Ranjha *et al.* (2020), por sua vez, desenvolveram barras de frutas funcionais fortificadas com 3% de extrato de casca de romã, e reportaram aumento no conteúdo de polifenóis das barras com a adição do extrato.

Figura 1.12. Estrutura química dos principais fenólicos encontrados na casca da romã: (a) ácido gálico, (b) ácido cafeico, (c) ácido clorogênico, (d) ácido elágico, (e) epicatequina, (f) rutina e (g) punicalagina.



Fonte: autoria própria.

A aplicação de extratos de casca de romã em revestimentos comestíveis à base de quitosana também vem sendo reportada desde 2017. A Tabela 1.3 sumariza alguns dos principais trabalhos com essa aplicação para frutas e vegetais, e os principais efeitos decorrentes da adição dos extratos e da aplicação dos revestimentos.

Tabela 1.3. Revestimentos comestíveis à base de quitosana contendo extratos de casca de romã e seus efeitos sobre os alimentos revestidos.

Material de revestimento	Extrato de casca de romã	Alimento revestido	Efeitos	Referência
Quitosana/pululana	Aquoso, 0,02 g mL ⁻¹	Lichia	Redução na perda de massa e aumento do conteúdo de fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante. Melhoria dos atributos sensoriais.	KUMAR <i>et al.</i> , 2020
Quitosana/pululana	Aquoso, 0,02 g mL ⁻¹	Pimentões verdes	Redução na perda de massa e no escurecimento, manutenção do teor de sólidos solúveis, da acidez, do pH e da firmeza. Melhoria dos atributos sensoriais (frescor, cor, sabor).	KUMAR <i>et al.</i> , 2021a
Quitosana/pululana	Aquoso, 0,02 g mL ⁻¹	Mangas	Redução na perda de massa, manutenção do teor de sólidos solúveis, da acidez, do pH e dos atributos sensoriais. Manutenção do conteúdo de fenólicos, flavonoides e da atividade antioxidante.	KUMAR <i>et al.</i> , 2021b
Quitosana	Etanólico (80%, v/v), 2%	Peras	Redução na perda de massa e na contaminação, manutenção da firmeza. Redução nas atividades enzimáticas e melhoria dos atributos sensoriais.	MEGHA <i>et al.</i> , 2021
Quitosana/alginato	Seco, 0,5-2,5%	Tomates	Menores reduções na firmeza e no conteúdo de licopeno dos tomates e manutenção dos atributos sensoriais. Redução na contaminação por <i>Fusarium oxysporum</i> .	SAEED <i>et al.</i> , 2022

Fonte: autoria própria.

A partir do que foi exposto, encontram-se muitos artigos na literatura que desenvolveram revestimentos poliméricos naturais para morangos (Tabela 1.2), bem como muitos artigos que utilizaram quitosana como polímero base e extrato de casca de romã como fonte de compostos fenólicos em materiais de recobrimento de outros frutos (Tabela 1.3). Entretanto, a combinação de quitosana, gelatina e extrato de casca de romã em um revestimento polimérico natural para morangos ainda é inédita. Assim, o objetivo geral desta tese foi o desenvolvimento de revestimentos à base de quitosana, gelatina e extrato de casca de romã para a manutenção da qualidade físico-química, microbiológica e sensorial de morangos, ao longo de seu armazenamento.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO DOS REVESTIMENTOS POLIMÉRICOS DE QUITOSANA, GELATINA E EXTRATO DE CASCA DE ROMÃ

1. INTRODUÇÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados da etapa de otimização multivariada da formulação polimérica de quitosana, gelatina e extrato de casca de romã. A maior parte dos resultados aqui apresentados faz parte do artigo intitulado “*Central composite design optimization of active and physical properties of food packaging films based on chitosan/gelatin/pomegranate peel extract*”, que foi publicado no periódico internacional “*Food Packaging and Shelf Life*” (fator de impacto = 8,0 em 2023) (BERTOLO *et al.*, 2022). Este artigo pode ser visualizado no Anexo I desta tese. Além disso, estes resultados também foram utilizados para o depósito da patente BR 10 2021 026404: “Composições poliméricas com propriedades antioxidantes e antimicrobianas para revestimento de frutas, método de preparação do revestimento e seu uso” (BERTOLO *et al.*, 2021b) (Anexo II).

Assim, o objetivo principal deste capítulo foi o de otimizar a formulação dos materiais poliméricos que serão utilizados para o revestimento de morangos a fim de melhorar a vida de prateleira dos frutos, reutilizando para isso resíduos agroindustriais como é o caso do extrato de casca de romã. Sendo assim, os objetivos específicos deste capítulo são: (i) a obtenção do extrato de casca de romã via extração assistida por ultrassom; (ii) a obtenção e caracterização da quitosana a partir de gládios de lula; (iii) a otimização da formulação das proporções dos materiais do revestimento (quitosana, gelatina e extrato) considerando suas características de: conteúdo total de fenólicos, viscosidade, solubilidade, opacidade e taxa permeabilidade ao vapor d’água.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

As romãs utilizadas nesta pesquisa foram as do tipo vermelhas (variedade peruana), que foram adquiridas frescas (no dia seguinte à sua colheita) na Central de Abastecimento de Campinas – S.A. (CEASA) em fevereiro de 2019. Os gládios de lula (*Doryteuthis* spp.) utilizados como fonte de β -quitina para a obtenção da quitosana foram gentilmente cedidos pela empresa Miami Comércio e Exportação de Pescados LTDA (Cananéia – SP). A gelatina utilizada foi comercial (Sigma-Aldrich®), do tipo A, suína, com aproximadamente 300 *bloom*. Todos os solventes e reagentes utilizados nas preparações e caracterizações foram de grau PA ou superior e utilizados como tal.

2.2 Obtenção e caracterização do extrato de casca de romã

Para a obtenção do extrato de casca de romã, os frutos foram lavados, sanitizados e descascados manualmente. Suas cascas foram lavadas, congeladas e liofilizadas em um equipamento da marca Edwards, modelo Freeze Dryer Modulyo (Edwards High Vacuum International). Uma vez liofilizadas, as cascas foram trituradas para a obtenção de um pó fino, o qual foi armazenado em sacos plásticos selados a -8 °C, ao abrigo da luz. Para a extração, 15 g do pó da casca da romã foram colocados em solução etanólica 60% (v/v), na proporção de 1:30, a 45 °C durante 1 h em um banho de ultrassom (Unique USC-1400 A, 135 W), seguindo o procedimento descrito por Bertolo *et al.* (2020). Após a extração e liofilização, o extrato foi armazenado ao abrigo da luz, a -8 °C.

2.2.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

O extrato da casca de romã obtido na etapa anterior foi caracterizado por FTIR com reflectância total atenuada (ATR). Para isso, o extrato em pó foi mantido em dessecador na presença de NaOH_(s) por 48 h antes da análise, para remoção da umidade. Em seguida, os espectros foram obtidos de 4000 a 650 cm⁻¹, com resolução de 2 cm⁻¹ e acumulando 16 varreduras, em um equipamento modelo FT-IR - Cary 630, da Agilent Technologies. O FTIR-ATR utilizado está alocado no Centro de Pesquisas em Óptica e Fotônica (CEPOF), do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP).

2.2.2 Conteúdo total de fenólicos

O extrato de casca de romã também teve seu conteúdo total de fenólicos determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999; YOO *et al.*, 2018), com procedimento adaptado para uma microplaca de 96 poços. Para a reação, 25 µL da amostra de extrato (diluída 250 vezes em água) e 25 µL do reagente de Folin foram incubados por 5 min. Em seguida, para interromper a reação, foram adicionados 200 µL de uma solução de carbonato de sódio 20% (g/g), seguido por nova agitação. Então, após 15 min, a absorbância das amostras foi lida em 725 nm, em um espectrofotômetro UV-Vis modelo VL0L00D0 (Thermo Scientific), equipamento alocado no Grupo de Química Inorgânica e Analítica do IQSC/USP. Para a construção da curva de calibração do método foi utilizado o padrão de ácido gálico (4 - 32 µg mL⁻¹, Sigma-Aldrich®) (Figura A1 nos apêndices desta tese), enquanto uma solução de etanol 60% (v/v) foi utilizada como branco. O conteúdo total de fenólicos foi calculado com o auxílio da curva de calibração e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato.

2.2.3 Ensaio antioxidante frente ao radical ABTS

A atividade antioxidante do extrato foi determinada frente ao radical ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)), conforme método adaptado de Re *et al.* (1999) para uma microplaca de 96 poços. O ABTS radicalar foi preparado pela reação de uma solução 14 mmol L⁻¹ do ácido sulfônico com uma solução 4,9 mmol L⁻¹ de persulfato de potássio, por 15 h no escuro, seguido por diluição em etanol para ajuste da absorbância em 734 nm. Para a construção da curva de calibração do método foi utilizado o padrão de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), um análogo hidrossolúvel da vitamina E (2,5 a 20 µmol L⁻¹, Sigma-Aldrich®) (Figura A2 nos apêndices desta tese).

Uma solução etanólica 60% (v/v) do extrato de casca de romã a 50 µg mL⁻¹ foi colocada para reagir com o radical ABTS e monitorou-se o decaimento da absorbância durante 10 min em 734 nm, em um espectrofotômetro modelo Multiskan GO, da Thermo Scientific. Como branco, utilizou-se a solução etanólica 60% (v/v). A análise foi feita em triplicata e a % de inibição foi calculada de acordo com a Equação (2.1), onde *Abs branco* é a absorbância do branco ao final dos 10 min de reação e *Abs final* é a absorbância da amostra ao final dos 10 min de reação. Os

resultados foram expressos em mmol de equivalentes de Trolox g⁻¹ de extrato, com o auxílio da curva de calibração.

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{Abs branco} - \text{Abs final}}{\text{Abs branco}} \times 100 \quad \text{Equação (2.1)}$$

2.2.4 Ensaio antioxidante frente ao radical livre DPPH

A atividade antioxidante do extrato frente ao radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi determinada segundo método descrito por Pal *et al.* (2017), adaptado para uma microplaca de 96 poços. Uma solução etanólica do radical na concentração de 0,1 mmol L⁻¹ foi colocada para reagir com seis diferentes concentrações de soluções etanólicas (60%, v/v) de extrato (de 3,125 a 100 µg mL⁻¹), na proporção de 20 µL de amostra, 160 µL de etanol e 100 µL de radical. Monitorou-se o decaimento da absorvância durante 30 min em um espectrofotômetro modelo Multiskan GO (Thermo Scientific) e a % de inibição foi calculada de acordo com a Equação (2.1). A partir da construção de uma curva de % de inibição *versus* log da concentração de extrato e do ajuste sigmoide dos pontos (CHEN; BERTIN; FROLDI, 2013) determinou-se o IC₅₀, ou seja, a concentração de extrato necessária para inibir 50% do radical DPPH. Com esse valor foi possível o cálculo do IAA (índice de atividade antioxidante do extrato), segundo a Equação (2.2) (SCHERER; GODOY, 2009). O antioxidante BHT (hidroxitolueno butilado), obtido da Sigma-Aldrich®, foi utilizado como molécula padrão para fins de comparação da atividade antioxidante do extrato de romã, nas concentrações de 3,125 a 100 µg mL⁻¹.

$$\text{IAA} = \frac{\text{concentração final de DPPH no poço reacional} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right)}{\text{IC}_{50} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right)} \quad \text{Equação (2.2)}$$

2.2.5 Estabilidade do extrato em função do pH e da temperatura

A estabilidade do extrato de casca de romã foi avaliada em função do pH (3, 7 e 11) e da temperatura (4, 25 e 37 °C), a fim de simular as diferentes condições nas quais o extrato pode ser submetido durante as etapas de preparo do revestimento e de aplicação nos frutos. Para tanto, foi preparada uma solução etanólica estoque (60%, v/v) de extrato a 1 mg mL⁻¹, que foi então diluída para 250 µg mL⁻¹ nos diferentes pH. Para o ensaio de temperatura, o extrato foi diluído em solução tampão composta por ácido cítrico (0,1 mol L⁻¹) e Na₂HPO₄ (0,2 mol L⁻¹), pH 3,4, e mantido

nas diferentes temperaturas por 24 h. A absorbância dos extratos foi obtida por varredura de 200 a 600 nm, em um espectrofotômetro UV-Vis modelo U-300 da Hitachi.

2.3 Obtenção e caracterização da quitosana

Os gládios de lula (*Doryteuthis* spp.) foram submetidos às etapas de desmineralização-desproteíntização e desacetilação, conforme procedimento descrito por Horn, Martins e Plepis (2009). O experimento de obtenção da quitosana foi conduzido no laboratório do Grupo de Biopolímeros e Biomateriais do IQSC/USP. Inicialmente, os gládios foram lavados para a eliminação de resíduos, secos, triturados e peneirados para a obtenção de um pó com partículas menores que 250 μm . A etapa de desmineralização-desproteíntização foi repetida duas vezes pela adição do pó em uma solução de NaOH 0,3 mol L⁻¹, sob agitação constante por 1 h a 80 °C. O sólido resultante da filtração após essa etapa, a β -quitina, foi lavado com água deionizada até sua neutralidade (pH 7,0) e seco em estufa a 37 °C. Na etapa de desacetilação, a β -quitina foi adicionada à uma solução de NaOH 40% (m/v), sob agitação constante por 3 h a 80 °C, sob atmosfera de N₂. Após repetição dessa etapa, o sólido resultante, a quitosana, foi lavado até a neutralidade (pH 7,0) e seco em estufa a 37 °C. A quitosana seca foi armazenada em recipiente plástico fechado, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente.

2.3.1 Grau de acetilação da quitosana por RMN ¹H

Para a determinação do grau de acetilação (GA) da quitosana foi utilizado o método proposto e validado por Lavertu *et al.* (2003). Para isso, 10 mg de quitosana foram pesados e dissolvidos em 1,96 mL de D₂O e 0,04 mL de DCI. Para as análises foi utilizado o espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) com Transformada de Fourier, modelo 500/54 Premium Shielded, da marca Agilent Technologies, equipamento da Central de Análises Químicas Instrumentais do IQSC/USP. A análise foi feita a 70 °C e 400 MHz de frequência, acumulando um total de 64 varreduras. Utilizou-se uma sequência consistindo em um atraso de 6 s, um pulso de 90° de 11 ms e um tempo de aquisição de 5,1 s. Durante o intervalo de 6 s antes da aplicação do pulso de 90° foi realizada a supressão do sinal do solvente por saturação usando um pulso longo e de baixa potência na frequência do solvente.

2.3.2 Massa molar viscosimétrica média

A massa molar média da quitosana foi determinada por viscosimetria capilar (RINAUDO, 2006). Esse método determina a viscosidade de soluções diluídas de quitosana, que posteriormente foi relacionada à massa molar do polímero pela equação de Mark-Houwink (Equação (2.3)).

$$[\eta] = kM^\alpha \quad \text{Equação (2.3)}$$

Na equação, $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca, M é a massa molar viscosimétrica média e k e α são constantes empíricas que dependem da natureza do polímero, do solvente e da temperatura. De acordo com o grau de acetilação obtido, os valores utilizados foram $k = 0,077$ e $\alpha = 0,797$ (RINAUDO, 2006). A solução de quitosana foi preparada por meio da dissolução da mesma em 50 mL de tampão ácido acético $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ e acetato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, sob agitação por 24 h. Em seguida, filtrou-se a solução sob pressão positiva em membrana de nitrocelulose com poros de $0,8 \text{ }\mu\text{m}$ (Unifil®).

Para determinar os tempos de escoamento, alíquotas de 15 mL foram inseridas em um viscosímetro capilar de vidro do tipo Ubbelohde, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Foram então feitas três determinações independentes dos valores de tempo de escoamento, tanto para o tampão quanto para cada solução de quitosana nas diferentes concentrações (isto é, diluições sucessivas com 1,0, 2,0, 3,0, e 4,0 mL do tampão). Para estas análises o equipamento utilizado foi um viscosímetro AVS-360 (Schott), acoplado a um diluidor automático TITRONIC universal (Schott), equipamento este alocado no Grupo de Físico-Química Orgânica do IQSC/USP. O valor de massa molar viscosimétrica foi determinado em triplicata.

2.3.3 Massa molar absoluta

A quitosana obtida também teve sua massa molar absoluta (M_w) determinada, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão de tamanho com detector de espalhamento de luz (SEC-MALS). Os equipamentos utilizados foram um cromatógrafo da Waters e detectores da Wyatt (modelos e2695/MiniDawn/Optlab), alocados na Central de Análises Químicas Instrumentais do IQSC/USP.

Para as análises, foram preparadas soluções de quitosana em tampão ácido acético 0,3 mol L⁻¹ e acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹, pH 4,5, sob agitação por 24 h, nas concentrações de 0,25 a 2 mg mL⁻¹. O fluxo na coluna foi de 0,5 mL min⁻¹, e o detector por índice de espalhamento utilizado foi de sílica fundida, em 659 nm. Além disso, a partir da detecção do índice de refração dessas amostras foi determinado o parâmetro dn/dc, ou incremento do índice de refração específico, o qual foi utilizado para a determinação da massa molar absoluta da quitosana por meio da Equação de Zimm (Equação (2.4)).

$$\frac{K_c}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} \left[1 + \frac{16\pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} Rg^2 \text{sen}^2 \frac{\theta}{2} \right] + 2A_2C \quad \text{Equação (2.4)}$$

Na equação, K_c é a constante óptica, R_θ é a razão de Rayleigh, n é o índice de refração do solvente, λ é o comprimento de onda, Rg é o raio de giro, A_2 é o segundo coeficiente virial e C é a concentração (NANDI, 2011).

2.4 Design experimental para otimização das proporções das misturas poliméricas dos revestimentos

Uma vez que o extrato de casca de romã foi preparado e caracterizado e a quitosana foi obtida e seus parâmetros foram determinados, deu-se início a um delineamento composto central rotacional (DCCR) para a otimização das proporções entre os três componentes dos revestimentos a serem preparados: quitosana, gelatina e extrato. Para tanto, foram adotadas como variáveis a % de quitosana presente nas misturas e a concentração da solução etanólica de extrato adicionada a cada 50 g da mistura quitosana + gelatina (Tabela 2.1). No total, foram preparadas 12 misturas, sendo 4 delas com pontos fatoriais (-1 e 1), 4 delas com pontos axiais (-1,41 e 1,41, vindos da fórmula $\alpha = (2^n)^{1/4}$, na qual n é o número de variáveis) e 4 delas réplicas nos pontos centrais, conforme mostra a Tabela 2.2. Os valores de partida (pontos centrais) do DCCR foram escolhidos de acordo com um trabalho prévio sobre o sistema quitosana + gelatina + extrato de casca de romã (BERTOLO *et al.*, 2020).

Tabela 2.1. Variáveis estudadas no DCCR para a otimização das proporções entre os três componentes dos revestimentos (quitosana, gelatina e extrato de casca de romã), com seus respectivos fatores, níveis e domínio experimental codificados e reais.

Variável	Símbolo	Níveis codificados				
		-1,41	-1	0	1	1,41
X1 (mg extrato mL ⁻¹)	A	29,5	50	100	150	170,5
X2 (% de quitosana)	B	0,08	0,20	0,50	0,80	0,92

Fonte: autoria própria.

Tabela 2.2. Matriz do DCCR adotada para a otimização das proporções entre os três componentes dos revestimentos poliméricos, com os valores reais e codificados das variáveis adotadas no preparo de cada uma das 12 misturas.

N	A	[extrato] (mg mL ⁻¹)	B	% quitosana
1	-1	50	-1	0,20
2	1	150	-1	0,20
3	-1	50	1	0,80
4	1	150	1	0,80
5	0	100	0	0,50
6	0	100	0	0,50
7	0	100	0	0,50
8	0	100	0	0,50
9	-1,41	29,5	0	0,50
10	1,41	170,5	0	0,50
11	0	100	-1,41	0,08
12	0	100	1,41	0,92

Fonte: autoria própria.

Para o preparo das misturas, uma solução de quitosana 1% (g/g) foi preparada em ácido láctico (Carlo-Erba®), sob agitação a 250 rpm, por 24 h. A solução de gelatina 1% (g/g) foi preparada em água, a 60 °C por 30 min, seguida por gelificação a 4 °C por 2 h.

As misturas foram preparadas pelo gotejamento das soluções etanólicas do extrato de casca de romã (1 mL a cada 50 g de mistura, levando às concentrações finais de 0,59, 1, 2, 3 e 3,41 mg de extrato g⁻¹ mistura) na solução de quitosana 1% (g/g), sob agitação a 500 rpm em 45 °C, por 2 h, seguido da adição da solução de gelatina 1% (g/g). As proporções e quantidades necessárias foram seguidas de acordo com o DCCR.

É importante ressaltar aqui que, para cada uma das misturas, a concentração final foi mantida em 1% de quitosana + gelatina; sendo assim, as porcentagens de gelatina utilizadas foram complementares às quantidades de quitosana apresentadas na Tabela 2.2. Uma vez prontas, as misturas foram armazenadas sob refrigeração em frascos âmbar, para as análises posteriores. Parte delas foi pesada em moldes de Teflon® (mantendo-se o controle da gramatura, ou seja, de g de mistura por cm² de área do molde) e armazenadas por uma semana ao abrigo da luz, para o procedimento de *casting* (evaporação natural do solvente) e formação dos filmes.

Uma vez secos, os filmes foram estabilizados em umidade relativa (UR) de 75% (para simular condições de umidade de um país tropical) com auxílio de solução saturada de cloreto de sódio a 25 °C, em uma câmara com higrômetro.

2.5 Respostas avaliadas no DCCR

Para as 12 misturas preparadas conforme descrito anteriormente, foram avaliadas 5 respostas: conteúdo total de fenólicos e viscosidade, no caso das soluções filmogênicas e, opacidade, solubilidade e taxa de permeabilidade ao vapor d'água (TPVA), para os filmes por elas formados. Todas as análises foram feitas em triplicata.

O modelo gerado pelo programa Statistica® 13 foi submetido à análise de variância (ANOVA) para avaliação de sua significância, de seu coeficiente de determinação (R²) e de sua falta de ajuste. Além das 5 respostas avaliadas, foram também conduzidos testes antimicrobianos contra os dois fungos deteriorantes de maior incidência em morangos, *R. stolonifer* e *B. cinerea*. Entretanto, esses resultados não foram incluídos no planejamento, uma vez que muitas amostras não apresentaram halo de inibição contra os fungos, zerando as respostas no planejamento, o que interferiria na análise do modelo gerado (conforme será discutido nos resultados).

2.5.1 Conteúdo total de fenólicos

O conteúdo total de fenólicos das 12 misturas poliméricas preparadas a partir do DCCR foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme descrito na seção 2.2.1. Para tanto, as misturas foram diluídas em água na concentração de

50 mg mL⁻¹, sendo a água utilizada como branco. O conteúdo total de fenólicos foi expresso em mg EAG mg⁻¹ de mistura.

2.5.2 Viscosidade

A viscosidade das misturas foi avaliada em função da taxa de cisalhamento, de 0,1 a 1000 s⁻¹ a 25 °C, em um reômetro de deformação controlada AR-1000N (TA Instruments), com geometria de cone placa de aço inoxidável de 20 mm de diâmetro, ângulo de 2° e um *gap* de 69 µm, equipamento do Grupo de Biopolímeros e Biomateriais do IQSC/USP.

Um sistema Peltier foi utilizado para controle da temperatura, com precisão de 0,1 °C. Os modelos de Carreau (Equação (2.5), para as amostras 1 e 9-12 do DCCR) e Cross (Equação (2.6), para as amostras 2-8 do DCCR) foram utilizados para a modelagem das curvas e determinação da viscosidade das amostras.

$$\frac{\eta - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = \frac{1}{(1 + (k\gamma)^2)^{n/2}} \quad \text{Equação (2.5)}$$

$$\frac{\eta - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = \frac{1}{(1 + (k\gamma)^n)} \quad \text{Equação (2.6)}$$

Nas equações, η_0 e η_{∞} são as viscosidades no platô newtoniano a zero de cisalhamento e máxima a cisalhamento infinito, respectivamente, ambas em Pa s; γ é a taxa de cisalhamento (s⁻¹), k e n são constantes, sendo k o índice de consistência (s) e n o índice de taxa (adimensional).

2.5.3 Espessura, solubilidade e opacidade

Os filmes obtidos pelo *casting* das misturas em moldes de Teflon® foram caracterizados quanto a sua espessura com o auxílio de um micrômetro M110-25 (Mitutoyo Mfg. Co.). Para tanto, foram feitas 20 determinações em diferentes pontos dos filmes. A espessura não entrou como resposta do planejamento experimental, mas foi necessária para o cálculo da opacidade e da TPVA dos filmes. A solubilidade foi determinada segundo método adaptado de Peng, Wu e Li (2013), que envolveu a secagem dos filmes por 24 h a 80 °C seguida pela a estabilização da temperatura dos filmes em dessecador com NaOH_(s). Então, foi feita a pesagem inicial dos filmes secos (m_1). Em seguida, os filmes foram colocados em 10 mL de água deionizada e agitados por 6 h a 25 °C, a fim de simular condições forçadas de solubilização. Após nova secagem a 80 °C por 24 h e nova estabilização da

temperatura em dessecador, os filmes foram pesados novamente, determinando-se m_2 , a massa final dos filmes secos após a solubilização. A % de solubilidade foi calculada segundo a Equação (2.7).

$$\text{Solubilidade (\%)} = \left(\frac{m_1 - m_2}{m_1} \right) \times 100 \quad \text{Equação (2.7)}$$

A opacidade dos filmes à passagem de luz visível foi determinada pela medida da absorvância dos mesmos em 600 nm, segundo método descrito por Peng e Li (2014); para tanto, foi utilizado um espectrofotômetro (U-3000, Hitachi) e as medidas de absorvância foram feitas em triplicata para cada filme. A opacidade foi calculada segundo a Equação (2.8).

$$\text{Opacidade (A mm}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Absorvância}_{600 \text{ nm}}}{\text{Espessura}} \quad \text{Equação (2.8)}$$

2.5.4 Taxa de permeabilidade ao vapor d'água (TPVA)

A TPVA dos filmes foi determinada usando o método padrão ASTM E96-E96M-16 (ASTM, 2016), conforme descrito por Oliveira Filho *et al.* (2020). Para tanto, os filmes foram selados em copos de permeação (de 35 mm de diâmetro), contendo 6 mL de água deionizada. Os copos foram pesados no início do procedimento e colocados em uma estufa de circulação de ar marca Solab, modelo SL-102, a 40 °C, contendo sílica gel ativada (UR = 0%). A massa dos copos foi determinada a cada 2 h, por 8 h, sendo o ponto final obtido após 32 h. Finalmente, a taxa de permeabilidade ao vapor d'água ($\text{g mm h}^{-1} \text{cm}^{-2} \text{Pa}^{-1}$) foi calculada com o auxílio da Equação (2.9). Na equação, m é a perda de massa dos copos contendo os filmes, devido à evaporação da água, A é a área do filme selado no copo, t é o tempo de análise e Δp é a diferença da pressão de vapor da água entre o interior e o exterior dos copos. As análises foram feitas no Laboratório de Tecnologia Pós-Colheita de frutas e hortaliças, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Instrumentação, São Carlos, SP, Brasil).

$$\text{TPVA (g mm h}^{-1} \text{cm}^{-2} \text{Pa}^{-1}\text{)} = \frac{m}{t A \Delta p} \quad \text{Equação (2.9)}$$

2.5.5 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das doze misturas obtidas com os experimentos do DCCR foi avaliada *in vitro* contra os fungos *R. stolonifer* e *B. cinerea*, seguindo

adaptações do método descrito por Oliveira Filho *et al.* (2019). Para tanto, 200 μL das soluções de esporos dos fungos, com concentrações ajustadas para 10^5 esporos mL^{-1} , foram inoculadas em placas com Ágar Batata Dextrose (BDA). Para isso, foram feitas perfurações com 10 mm de diâmetro na superfície do ágar endurecido, utilizando ponteiras esterilizadas. Então, 50 μL das misturas filmogênicas foram colocados nas perfurações sem ágar e as placas foram incubadas a 37 °C. Após 48 h foram medidos, com o auxílio de um paquímetro, os halos de inibição das misturas frente o *R. stolonifer* e, após 168 h (tempo necessário para o crescimento dos fungos), contra o *B. cinerea*. Estas análises foram feitas no Laboratório de Microbiologia da EMBRAPA Instrumentação. As medições dos halos de inibição foram feitas em triplicata para cada halo, na horizontal e na vertical.

2.6 Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi adotado para a análise de parametricidade e o programa ActionStat (Estatcamp, 2014, São Carlos, SP, Brasil) foi utilizado para avaliar a homogeneidade dos dados; dados paramétricos e homogêneos foram analisados quanto à sua significância pela ANOVA seguida pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e dados não paramétricos foram analisados quanto à sua significância pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Obtenção e caracterização do extrato de casca de romã

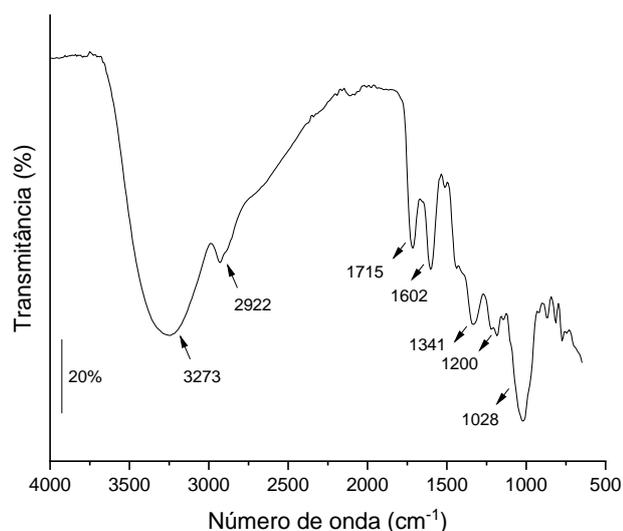
O extrato de casca de romã obtido apresentou aspecto seco e alaranjado, sendo o rendimento da extração 46,1% (Figura 2.1).

Figura 2.1. Fotografia digital do extrato de casca de romã em pó.



Fonte: autoria própria.

A Figura 2.2 mostra o espectro de FTIR-ATR obtido para o extrato de casca de romã. Em 3273 cm^{-1} observa-se uma banda larga referente ao estiramento das ligações O-H da água e dos grupos álcool, fenol e carboxílico presentes nos compostos fenólicos que compõem o extrato. O leve sinal em 2922 cm^{-1} é característico do estiramento C-H de grupos metil, metoxil e metileno, presentes nos ácidos fenólicos. As bandas vizinhas em 1715 e 1602 cm^{-1} representam as ligações C=O e C=C, referentes às carbonilas e às duplas ligações dos anéis aromáticos, respectivamente. Em 1341 , 1200 e 1028 cm^{-1} , as bandas de maior transmitância podem ser atribuídas ao estiramento de ligações N-H em amins secundárias, C-H em aromáticos, e C-C-N em amins (BERTOLO *et al.*, 2020; CHEYAD; SALMAN, 2017; SALEM; ALBANNA; AWWAD, 2017). A identificação das bandas presentes no espectro FTIR do extrato de romã possibilitou a confirmação qualitativa dos compostos de interesse do extrato, como os ácidos fenólicos e os flavonoides.

Figura 2.2. Espectro de FTIR-ATR do extrato de casca de romã.

Fonte: autoria própria.

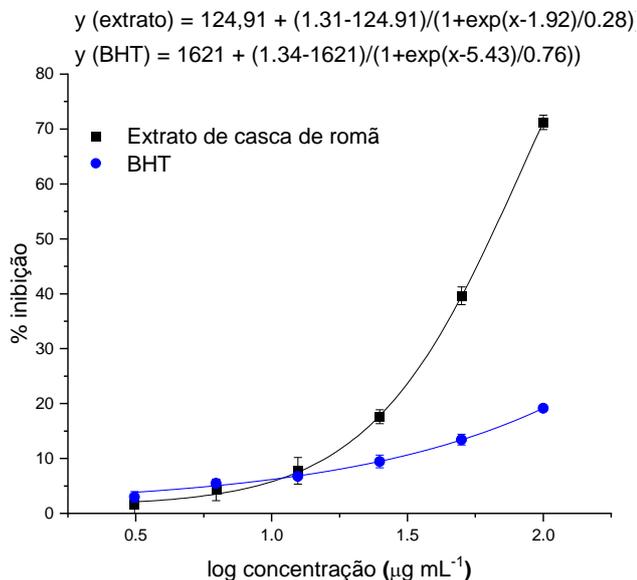
O conteúdo total de fenólicos do extrato foi determinado com o método de Folin-Ciocalteu, sendo igual a $215,71 \pm 5,95$ mg EAG g^{-1} extrato. Em um trabalho prévio, Bertolo *et al.* (2020) encontraram um conteúdo total de fenólicos de 492 ± 82 mg EAG g^{-1} extrato para um extrato de casca de romã amarela obtido por extração sólido-líquido por 1 h a 50 °C. É importante ressaltar que as diferenças encontradas no conteúdo total de fenólicos de diferentes extratos estão relacionadas não apenas ao tipo da fruta e sua variedade, espécie e sazonalidade, mas também ao modo de extração, tipo de solvente utilizado, temperatura, agitação, dentre outros. Sendo assim, os resultados encontrados pelo método de Folin-Ciocalteu acabam sendo um valor único para cada extrato obtido (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Em relação à atividade antioxidante frente ao radical ABTS, a solução de extrato a $5 \mu g mL^{-1}$ foi capaz de inibir $51,7 \pm 1,9\%$ do radical, o que corresponde a $1640,9 \pm 63,6 \mu mol$ equivalente de Trolox g^{-1} de extrato. Esse resultado foi superior ao encontrado por Pal *et al.* (2017) para o extrato de casca de romã, obtido por agitação por 12 h empregando etanol como solvente de extração: os autores reportaram que para inibir 50% do radical ABTS foi necessária uma concentração de $587,36 \mu g mL^{-1}$ de extrato, ou seja, um valor cerca de 117 vezes maior que a concentração do extrato de casca de romã preparado neste estudo.

A Figura 2.3 representa as % de inibição *versus* o log da concentração de amostra, obtidas pelo ensaio antioxidante do radical DPPH para o extrato de casca de romã e para o BHT, um antioxidante comercial muito utilizado pela indústria de

alimentos. Para ambas as amostras, observou-se um aumento na % de inibição contra o radical com o aumento da concentração do antioxidante ou extrato. A partir do ajuste sigmoide das curvas foi possível o cálculo do IC_{50} ; quanto menor esse valor, mais antioxidante é a espécie, uma vez que é necessária uma menor quantidade da mesma para se atingir 50% de inibição do radical livre. O valor de IC_{50} obtido para o extrato de casca de romã foi de $4,55 \mu\text{g mL}^{-1}$. Outros estudos na literatura reportaram valores semelhantes de IC_{50} para diferentes extratos de casca de romã: Pal *et al.* (2017) chegaram a um IC_{50} de $16,78 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto Okonogi *et al.* (2007) apontaram o extrato de casca de romã como sendo o mais antioxidante dentre os 8 extratos de cascas vegetais por eles investigados, com um IC_{50} de $3 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores de IC_{50} também estão diretamente relacionados não apenas ao conteúdo total de fenólicos de um extrato, mas também à natureza dos fenólicos obtidos durante o processo de extração.

Figura 2.3. Porcentagens de inibição de diferentes concentrações do extrato de casca de romã e do antioxidante comercial BHT (em $\mu\text{g mL}^{-1}$) contra o radical DPPH ($R^2 = 0,9996$ para a curva do extrato, $R^2 = 0,9955$ para a curva do BHT).



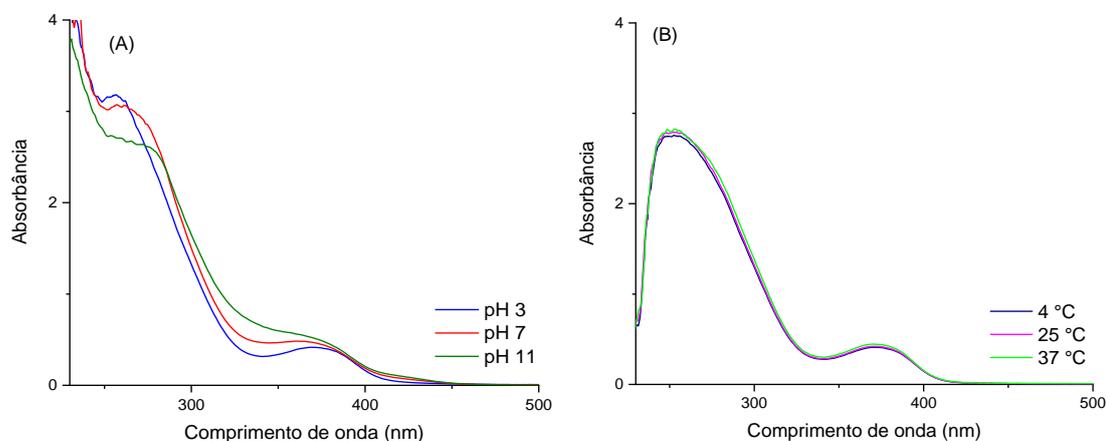
Fonte: autoria própria.

No caso do BHT, as % de inibição alcançadas frente o radical livre DPPH foram bem menores que aquelas do extrato de casca de romã, resultado este que demonstra o alto poder antioxidante do composto natural obtido neste estudo. O antioxidante comercial atingiu apenas 19,15% de inibição contra o radical, na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Com o valor de IC_{50} do extrato de casca de romã e da concentração final de DPPH no poço da microplaca ($13,57 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi possível o cálculo do IAA, o índice de atividade antioxidante do extrato, que foi igual a 2,98. De acordo com Scherer e Godoy (2009), valores de IAA maiores que 2,0 representam atividade antioxidante muito forte, situação na qual se encontra o extrato de casca de romã obtido nesse estudo.

Uma vez que o extrato de casca de romã foi preparado e caracterizado por FTIR-ATR, pelo seu conteúdo de compostos fenólicos totais e por sua atividade antioxidante, deu-se início ao estudo de estabilidade em função do pH do meio e da temperatura de armazenamento. Como a proposta do estudo é a de que o extrato de casca de romã atue como um composto ativo em revestimentos poliméricos, deve-se considerar as condições tecnológicas e de processamento que podem afetar sua estabilidade. Dessa forma, foram testados 3 valores de pH (3, 7 e 11, Figura 2.4(A)) e 3 valores de temperatura (4, 25 e 37 °C, Figura 2.4(B)).

Figura 2.4. Espectros de absorção no UV-Vis para o extrato de casca de romã ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) em (A) diferentes pH (3, 7 e 11) e (B) diferentes temperaturas (4, 25 e 37 °C).



Fonte: autoria própria.

Os espectros de absorção do extrato apresentaram um perfil semelhante em todos os casos, especialmente no estudo da variação da temperatura em pH (3,4). De modo geral, todas as 6 curvas da Figura 2.4 apresentaram duas bandas, características de compostos fenólicos, entre 250 e 370 nm. A banda de menor comprimento de onda, entre 250-260 nm, é denominada banda B. Esta banda sofreu variações mais bruscas em sua absorbância em função do pH: nos pH 3 e 7, λ_B ficou próximo dos 257 nm, e a absorbância não variou de forma considerável (Tabela 2.3). Entretanto, aumentando o pH do extrato para 11 observou-se um deslocamento de

λ_B para 254 nm e uma diminuição no valor de A_B . Essa banda está relacionada às transições eletrônicas para estados excitados no anel benzênico dos compostos fenólicos, o que pode justificar o fato dela ter sofrido maiores deslocamentos e mudanças de intensidade em um pH mais elevado (ROBARDS *et al.*, 1999; QU *et al.*, 2012).

Tabela 2.3. Valores de comprimento de onda (λ) e de absorbância máxima (A) para as bandas B e C dos espectros de absorção do extrato de casca de romã, em diferentes pH (3, 7 e 11) e em diferentes temperaturas (4, 25 e 37 °C).

pH	λ_B (nm)	A_B	λ_C (nm)	A_C
3	256,5	3,182	369	0,414
7	257	3,072	360,5	0,484
11	254	2,734	360,5	0,561
T (°C)	λ_B (nm)	A_B	λ_C (nm)	A_C
4	254	2,749	370	0,410
25	254	2,793	370,5	0,421
37	253	2,827	370	0,446

Fonte: autoria própria.

A segunda banda característica, por volta dos 360-370 nm, é denominada banda C e está relacionada à associação dos fenólicos com o solvente por meio de interações de hidrogênio. Esta banda ficou mais bem definida para o extrato em pH 3, apesar de ter sido neste pH que foi verificado o menor valor de absorbância. Além disso, esse valor aumentou de acordo com o aumento do pH, sendo que a banda se alargou e o λ_C foi deslocado para valores menores (360,5 nm). O extrato em pH 11 foi o que apresentou maior valor de absorbância para essa banda.

Qu *et al.* (2012) reportaram resultados semelhantes quando variaram o pH de seus extratos de casca de romã: apesar de não terem ultrapassado o pH 7,0, eles observaram que valores mais altos de pH levaram a uma mudança significativa nos compostos fenólicos do extrato, devido às mudanças observadas nos valores de A_B e A_C . Assim, os autores sugeriram valores de pH menores, como 3,5 e 5,0, como apropriados para manter a estabilidade estrutural do extrato de casca de romã.

Por outro lado, a variação de mais de 30 °C nas soluções do extrato armazenadas por 24 h aparentemente não trouxe mudanças significativas nas estruturas dos fenólicos. Tanto os valores de λ quanto os valores de absorbância ficaram muito próximos para as 3 temperaturas testadas, variando de 2,749 a 2,827

no caso de A_B, e de 0,410 a 0,446 no caso de A_C (Figura 2.4(B)). Assim, pode-se concluir que os espectros de absorção no UV-Vis de compostos fenólicos são dependentes de sua estabilidade estrutural, a qual foi mais influenciada pelo pH do que pela temperatura do meio. Portanto, visando a aplicação proposta neste estudo, pode-se dizer que a adição do extrato em revestimentos de quitosana e gelatina pode ser conduzida sem danos à estabilidade estrutural dos fenólicos e, conseqüentemente, ao seu potencial antioxidante.

3.2 Obtenção e caracterização da quitosana

Uma vez obtida a partir da desacetilação da β -quitina proveniente dos gládios de lula, a quitosana (Figura 2.5) foi seca e pesada. O rendimento foi de 29,5%, o que está dentro do esperado de acordo com outros trabalhos da literatura e com trabalhos prévios do grupo (BERTOLO *et al.*, 2020; KURITA, 2006).

Figura 2.5. Fotografia digital da quitosana em pó.



Fonte: autoria própria.

O grau de acetilação da quitosana foi caracterizado por RMN ¹H (Figura A3 nos apêndices desta tese). Para o cálculo foi utilizada a Equação (2.10), que relaciona as integrais das áreas dos picos H_{Ac} (referente aos hidrogênios da metila nos grupamentos acetilados) e H₂₋₆. O grau de acetilação determinado para a quitosana preparada foi de 11,1 ± 0,5%, também dentro do esperado conforme trabalhos prévios do grupo (BERTOLO *et al.*, 2020), o que significa que a etapa de desacetilação da quitina foi capaz de eliminar cerca de 89% dos grupos acetilados da estrutura do polímero. Quanto mais desacetilada é a quitosana (ou seja, quanto menor seu grau de acetilação), maior é a quantidade de grupos aminos disponíveis para a protonação na cadeia polimérica, o que aumenta a reatividade e a solubilidade da quitosana no meio (VEIGA, 2011).

$$GA (\%) = \left(\frac{H_{Ac}}{3} / \frac{H_{2-6}}{6} \right) \times 100 \quad \text{Equação (2.10)}$$

A análise de viscosimetria capilar (Tabela A1 nos apêndices desta tese) resultou em uma massa molar viscosimétrica média (M) para a quitosana de $(3,00 \pm 0,16) \times 10^5$ Da (ou 300 ± 16 kDa), podendo a quitosana obtida ser classificada como de alta massa molar viscosimétrica (>150 kDa) (BRUGNEROTTO *et al.*, 2001; RINAUDO, 2006).

Além da massa molar viscosimétrica, a massa molar absoluta (M_w) da quitosana foi determinada por meio de cromatografia líquida de exclusão de tamanho acoplada à detecção por espalhamento de luz. A Figura A4 nos apêndices desta tese mostra o gráfico de índice de refração diferencial *versus* concentração de amostra, o qual permitiu o cálculo do incremento do índice de refração da quitosana, ou dn/dc . Para a quitosana obtida neste estudo, o dn/dc foi de $0,2128 \pm 0,0071$ mL g⁻¹ ($R^2 = 0,9967$). Também na Figura A4, encontra-se o cromatograma com a distribuição da massa molar da quitosana em função do tempo. Por meio do ajuste dos dados pela Equação de Zimm, o M_w calculado para a quitosana foi de $(5,08 \pm 0,16) \times 10^5$ g mol⁻¹, o que confirma que a quitosana obtida neste estudo foi de alta massa molar.

3.3 Design experimental para otimização das proporções das misturas poliméricas dos revestimentos

Uma das tendências mais atuais no desenvolvimento de materiais de revestimento e embalagem é a aplicação de ferramentas quimiométricas que permitem otimizar as características desejadas do material polimérico de recobrimento, enquanto ao mesmo tempo reduzem o número de experimentos e o consumo de tempo, energia e reagentes. O uso dessas ferramentas muitas vezes também possibilita prever as características dos materiais e como elas podem variar de acordo com as modificações na composição dos mesmos (ISTIQOMAH *et al.*, 2022; SHARIFI; PIRSA, 2021). Nesse sentido, a aplicação do extrato de casca de romã como um componente ativo de materiais à base de quitosana e gelatina e sua influência na otimização da composição do material foram investigadas.

A Tabela 2.4 traz os resultados das formulações obtidas com o DCCR. Para a escolha da melhor composição de quitosana, gelatina e extrato de casca de romã nos revestimentos, levou-se em conta que seu conteúdo de fenólicos deveria ser considerável (demonstrando assim seu potencial antioxidante), enquanto sua viscosidade à zero de cisalhamento (η_0) deveria ser minimizada (já que materiais muito viscosos apresentam inúmeros desafios experimentais durante as etapas de aplicação dos revestimentos nos frutos).

As respostas de solubilidade e de taxa de permeabilidade ao vapor d'água dos filmes também deveriam ser as menores possíveis, uma vez que não é desejado que os filmes se desintegrem quando em contato com a água durante a lavagem dos frutos, bem como deseja-se que a perda de água dos morangos revestidos seja minimizada durante o armazenamento. Os resultados de opacidade, por sua vez, deveriam ser maximizados, uma vez que os filmes devem atuar como barreiras à passagem de luz para proteger os morangos de processos foto-oxidativos. Além disso, apesar de não terem entrado no planejamento, os resultados de halo de inibição contra os fungos foram levados em consideração na tomada de decisão para escolha da melhor mistura polimérica (Tabela 2.4).

Tabela 2.4. Resultados obtidos para as análises conduzidas com as 12 misturas do DCCR, adotado para a escolha das concentrações ideais de quitosana, gelatina e extrato de casca de romã nos revestimentos.

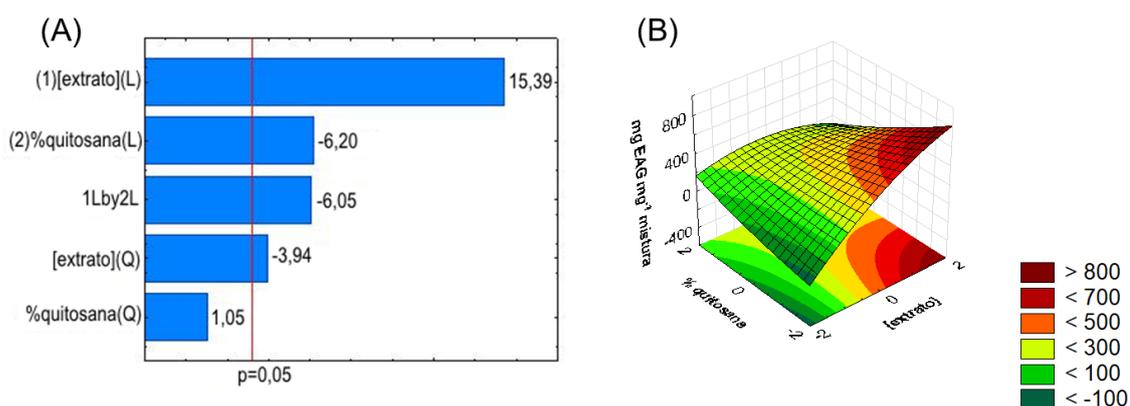
N	Fenólicos (mg EAG mg ⁻¹ mistura)	η_0 (Pa s)	Espessura (mm)	Solubilidade (%)	Opacidade (A mm ⁻¹)	TPVA (g mm h ⁻¹ cm ⁻² Pa ⁻¹ (E-08))	Halos de inibição (mm)	
							<i>R. stolonifer</i>	<i>B. cinerea</i>
1	197,02 ± 7,01 ^{fg}	4,24 ± 0,61 ^{def}	0,034 ± 0,004 ^e	19,80 ± 3,54 ^{bc}	10,49 ± 1,12 ^{cd}	1,97 ± 0,15 ^d	-	-
2	531,75 ± 21,58 ^a	1,59 ± 0,27 ^g	0,041 ± 0,002 ^{bc}	28,62 ± 5,44 ^{abc}	15,06 ± 1,12 ^{ab}	2,22 ± 0,08 ^d	-	-
3	169,65 ± 16,79 ^g	8,36 ± 0,20 ^c	0,035 ± 0,004 ^{de}	26,00 ± 5,50 ^{abc}	12,01 ± 0,29 ^c	2,75 ± 0,02 ^{abc}	-	6,17 ± 0,36 ^b
4	246,49 ± 28,05 ^f	5,40 ± 0,16 ^d	0,040 ± 0,005 ^{cd}	27,77 ± 0,49 ^{abc}	16,96 ± 0,83 ^a	3,54 ± 0,05 ^a	6,49 ± 0,42 ^b	9,78 ± 1,33 ^{ab}
5	312,81 ± 4,25 ^e	2,33 ± 0,07 ^{fg}	0,043 ± 0,003 ^{bc}	23,78 ± 0,64 ^{bc}	14,50 ± 0,98 ^b	2,69 ± 0,03 ^{bcd}	-	-
6	359,47 ± 19,56 ^{cde}	2,48 ± 0,19 ^{efg}	0,043 ± 0,004 ^{bc}	23,35 ± 1,37 ^{bc}	15,30 ± 0,58 ^{ab}	2,77 ± 0,05 ^{abc}	-	-
7	331,05 ± 34,80 ^{de}	2,70 ± 0,19 ^{efg}	0,043 ± 0,003 ^{bc}	22,13 ± 0,31 ^c	14,36 ± 0,36 ^b	2,77 ± 0,11 ^{abc}	-	-
8	315,96 ± 7,01 ^e	2,31 ± 0,12 ^{fg}	0,043 ± 0,003 ^{bc}	22,77 ± 4,74 ^c	14,32 ± 0,69 ^b	2,74 ± 0,03 ^{abcd}	-	-
9	100,53 ± 7,37 ^h	4,51 ± 0,14 ^{de}	0,046 ± 0,004 ^b	29,50 ± 0,66 ^{abc}	10,37 ± 0,40 ^{cd}	2,54 ± 0,02 ^{cd}	-	-
10	465,44 ± 8,83 ^b	2,29 ± 0,07 ^{fg}	0,052 ± 0,005 ^a	29,84 ± 0,20 ^{abc}	14,79 ± 0,69 ^b	2,44 ± 0,09 ^{cd}	-	-
11	388,25 ± 17,31 ^c	17,01 ± 2,32 ^a	0,042 ± 0,005 ^{bc}	50,74 ± 3,90 ^a	8,55 ± 0,30 ^d	2,40 ± 1,15 ^{cd}	-	-
12	345,43 ± 21,37 ^{cde}	11,31 ± 0,10 ^b	0,056 ± 0,005 ^a	31,98 ± 1,17 ^{ab}	10,58 ± 0,26 ^{cd}	3,07 ± 0,13 ^{ab}	16,63 ± 2,60 ^a	13,13 ± 1,73 ^a

Fonte: autoria própria. Em uma mesma coluna, valores com letras sobrescritas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) por ANOVA e Tukey.

3.3.1 Conteúdo total de fenólicos

A Figura 2.6(A) mostra o Diagrama de Pareto e o gráfico de superfície de resposta gerados para o conteúdo total de fenólicos das 12 misturas do planejamento. Os efeitos lineares das duas variáveis (concentração de extrato: +15,39 e % de quitosana: -6,20) foram significativos para o conteúdo de fenólicos, bem como a curvatura (-6,05), e o efeito quadrático da % de quitosana (-3,94) ($p \leq 0,05$, $R^2 = 0,91674$). Apenas a concentração de extrato teve efeito positivo (o de maior influência) sobre as respostas, o que já era esperado, uma vez que quanto maior a concentração de extrato de casca de romã adicionada às misturas poliméricas, maior seu conteúdo total de fenólicos. A % de quitosana teve um efeito menor e negativo, o que significa que foi inversamente proporcional à resposta encontrada para os fenólicos. Assim, quanto mais quitosana presente no revestimento, maior a interação com os fenólicos da casca de romã, que ficam menos disponíveis para interação com o reagente de Folin. Esses efeitos também podem ser observados na Figura 4.6(B): o conteúdo total de fenólicos seria maximizado para mais de 800 mg EAG mg⁻¹ na região de +1 a +2 de concentração de extrato e -1 a -2 de % quitosana (variáveis codificadas).

Figura 2.6. Diagrama de Pareto (A) e gráfico de superfície de resposta (B) para o conteúdo total de fenólicos das amostras do DCCR.



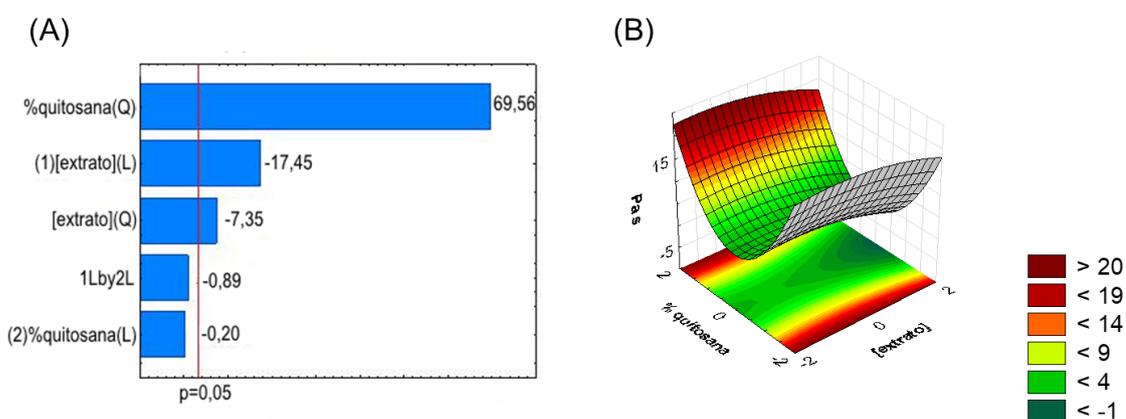
Fonte: autoria própria.

3.3.2 Viscosidade

A viscosidade das amostras apresentou-se altamente influenciada pelo efeito quadrático da % de quitosana (+69,56) e dependente em menor magnitude dos efeitos linear (-17,45) e quadrático (-7,35) da concentração de extrato, conforme mostrado no Diagrama de Pareto da Figura 2.7(A) ($R^2 = 0,73518$). Isso significa que

o fator de maior influência sobre a viscosidade dos revestimentos foi a quantidade de quitosana presente, sendo que quanto maior a concentração do polímero, maior a viscosidade. A adição do extrato de casca de romã, por outro lado, mostrou-se ser útil para diminuir a viscosidade dos revestimentos, apresentando um efeito negativo que indica que, quanto maior a concentração de extrato, menor a viscosidade. Tal efeito da adição dos fenólicos sobre a viscosidade dos sistemas poliméricos já havia sido reportado por Bertolo *et al.* (2020), em um estudo prévio em sistemas de quitosana e gelatina, com um intervalo de concentrações de extrato de casca de romã amarela de 50 a 200 mg mL⁻¹.

Figura 2.7. Diagrama de Pareto (A) e gráfico de superfície de resposta (B) para a viscosidade das amostras do DCCR.



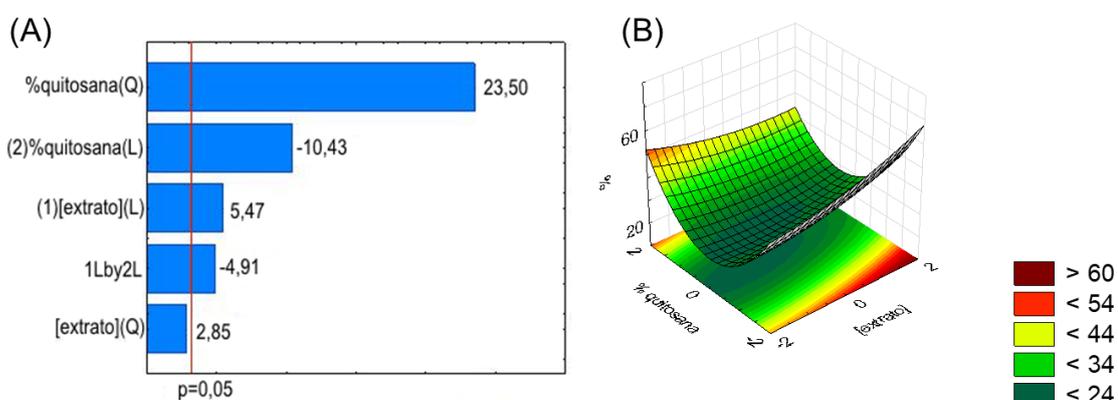
Fonte: autoria própria.

Soluções poliméricas de revestimento devem apresentar uma viscosidade moderada, ou seja, alta o suficiente para garantir um espalhamento uniforme do revestimento sobre a superfície da fruta (evitando um gotejamento exacerbado do material), e baixa o suficiente para que a fruta consiga ser imersa na solução, ou para que essa consiga ser pulverizada sobre a superfície da fruta (no caso de revestimentos por imersão ou por *spray*, respectivamente). Alguns autores sugerem que viscosidades entre 1 e 10 Pa s seriam as mais adequadas para garantir a execução de todos os processos tecnológicos envolvidos em um revestimento (NAIR *et al.*, 2011). No gráfico de superfície de respostas da Figura 2.7(B) observa-se que esse intervalo de viscosidades ficou entre as regiões amarela e verde, fugindo dos extremos de altas e de baixas concentrações de quitosana.

3.3.3 Solubilidade e opacidade

A solubilidade dos filmes também foi uma resposta a ser minimizada, uma vez que se busca por filmes poliméricos que não sejam facilmente removidos quando em contato com a água. Os efeitos de influência significativa sobre essa resposta foram os efeitos quadrático e linear da % de quitosana (+23,50 e -10,43, respectivamente), o efeito linear da concentração de extrato (+5,47) e a curvatura (-4,91), conforme mostrado no Diagrama de Pareto da Figura 2.8(A) ($R^2 = 0,51889$). Isso significa que concentrações maiores de quitosana levaram a uma menor solubilidade dos revestimentos, de forma linear. Entretanto, quando se analisa o efeito combinado dessa variável com ela mesma, a significância de sua influência aumenta, porém o efeito oposto é observado, ou seja, maiores concentrações de quitosana levam a uma maior solubilidade. Além disso, quanto maior a concentração de extrato, maior a solubilidade do filme, porém de forma menos influente que a % de quitosana. A Figura 2.8(B) mostra que solubilidades menores que 24% ficariam situadas na região central de % de quitosana, e com concentrações de extrato entre 0 e -2.

Figura 2.8. Diagrama de Pareto (A) e gráfico de superfície de resposta (B) para a solubilidade das amostras do DCCR.

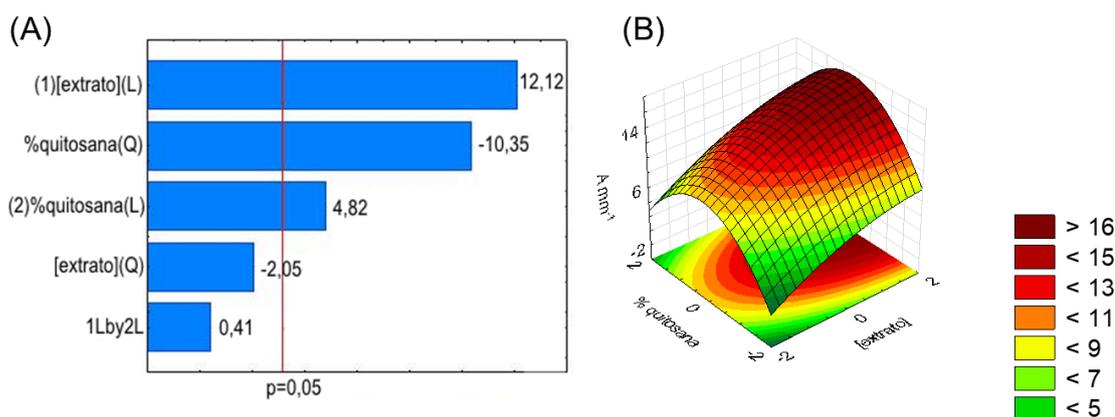


Fonte: autoria própria.

A opacidade, por sua vez, foi uma resposta a ser maximizada, uma vez que se deseja melhorar a propriedade de barreira dos filmes à passagem de luz. Para essa resposta, a concentração de extrato de casca de romã foi a variável de maior influência, com um efeito linear de +12,12, o que significa que a adição dos fenólicos do extrato diminuiu a transparência dos filmes. Tal fato já era esperado e também pode ser observado visualmente, uma vez que os filmes com mais extrato se apresentaram mais escuros e opacos. Os efeitos quadrático e linear da % de

quitosana também foram significativos (-10,35 e +4,82, respectivamente), conforme mostra o Diagrama de Pareto da Figura 2.9(A) ($R^2 = 0,79435$). Para se maximizar a opacidade, o gráfico de superfície de respostas da Figura 2.9(B) aponta para regiões vermelhas nos extremos positivos de concentração de extrato, e na região central de % de quitosana.

Figura 2.9. Diagrama de Pareto (A) e gráfico de superfície de resposta (B) para a opacidade das amostras do DCCR.



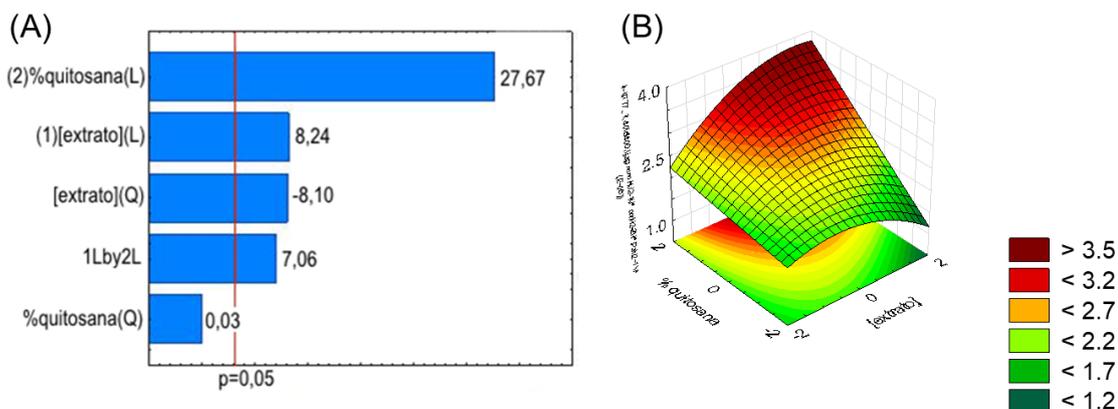
Fonte: autoria própria.

3.3.4 TPVA

Por fim, a TPVA dos filmes era a última resposta que se desejava minimizar, uma vez que filmes menos permeáveis tendem a controlar melhor a perda de água dos frutos por eles revestidos. Além disso, também é um parâmetro fundamental para a proteção da fruta da deterioração induzida pela água (que auxilia no crescimento de microrganismos). Nesse caso, a % de quitosana teve um efeito linear altamente significativo (+27,67), seguida pelos efeitos linear e quadrático da concentração de extrato (+8,24 e -8,10, respectivamente), e pela curvatura (+7,06) (Figura 2.10(A), $R^2 = 0,80796$). Isso demonstra que menores % de quitosana no sistema polimérico levaram a taxas de permeabilidade menores, em combinação com concentrações mais elevadas de extrato (Figura 2.10(B)). Tal resultado está de acordo com o esperado, uma vez que a literatura reporta altas taxas de permeabilidade ao vapor d'água para filmes de quitosana. A associação com a gelatina e com os componentes fenólicos diminui o espaço livre da rede polimérica formada, diminuindo assim a taxa de difusão das moléculas de água (WANG *et al.*, 2021a). Dessa forma, menores % de quitosana em combinação com a gelatina

possibilitam a formação de uma rede polimérica intrincada o suficiente para diminuir a passagem de água.

Figura 2.10. Diagrama de Pareto (A) e gráfico de superfície de resposta (B) para a TPVA das amostras do DCCR.



Fonte: autoria própria.

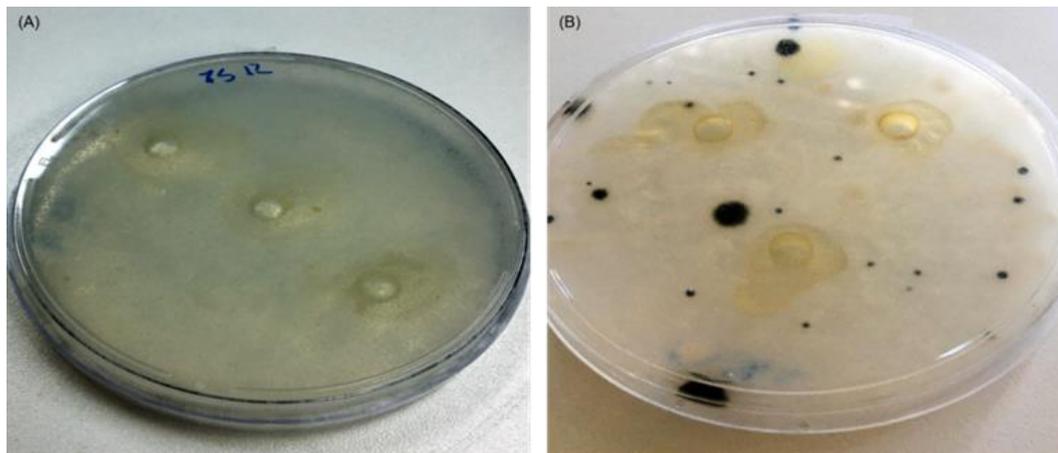
A Tabela A2 nos apêndices desta tese mostra os resultados de ANOVA obtidos para todas as respostas do DCCR discutidas acima. Com exceção do conteúdo total de fenólicos, todas as respostas do planejamento apresentaram falta de ajuste significativa, pois seus F_{cal} da falta de ajuste/erro puro foram menores que seus F_{tab} . Apesar disso, seus valores de R^2 permitem que esses resultados sejam considerados para a determinação da composição mais apropriada de quitosana, gelatina e extrato de casca de romã das misturas, dentro das condições testadas, sem fazer previsões e/ou extrapolações (BOGUSZ et al., 2011).

3.3.5 Atividade antimicrobiana

Conforme pode ser observado na Tabela 2.4, apenas as misturas 4 e 12 apresentaram halo de inibição contra os fungos *R. stolonifer* e *B. cinerea*, sendo que para esse último fungo também foi detectada inibição para a mistura 3. A variável em comum entre as três amostras foi a alta concentração de quitosana nelas presente, correspondente a 0,8% nas misturas 3 e 4, e a 0,92% na mistura 12. De maneira geral, os diâmetros dos halos de inibição aumentaram de acordo com o aumento na concentração de quitosana da mistura, para um mesmo fungo. Mais ainda, o aumento em 3x na concentração de extrato de casca de romã, de 50 mg mL^{-1} na amostra 3 para 150 mg mL^{-1} na 4, levou a uma tendência de aumento no halo de inibição contra o fungo *B. cinerea* (de $6,17 \pm 0,36 \text{ mm}$ para $9,78 \pm 1,33 \text{ mm}$, respectivamente), o que sugere que a presença do extrato pode ter

contribuído para uma maior ação antimicrobiana, uma vez que a % de quitosana era a mesma para ambas as amostras. A Figura 2.11 mostra os halos de inibição formados pela mistura 12 contra o crescimento do *R. stolonifer* (Figura 2.11(A)) e do *B. cinerea* (Figura 2.11(B)).

Figura 2.11. Halos de inibição da amostra 12 contra: (A) *R. stolonifer* e (B) *B. cinerea*.



Fonte: autoria própria.

Os resultados de atividade antimicrobiana das misturas, apesar de não terem sido incluídos na análise do planejamento pelo Statistica®, foram determinantes para a escolha da mistura que daria seguimento aos estudos de caracterização e revestimento, uma vez que demonstraram a importância de concentrações mais elevadas de quitosana em relação à gelatina para a segurança microbiológica. Assim, visando-se respeitar às necessidades de concentrações moderadas de quitosana para a minimização da viscosidade, da TPVA e da solubilidade dos revestimentos, mas ao mesmo tempo escolhendo-se uma concentração alta o suficiente para o desempenho da atividade antifúngica, optou-se pela amostra 3 da Tabela 2.4. Seu filme mostrou valores de solubilidade e TPVA menores que os filmes 4 e 12, e a viscosidade de sua mistura foi menor que a da mistura 12. Além disso, a mistura 3 foi capaz de inibir o fungo *B. cinerea* no modelo *in vitro*, sugerindo resultados promissores para a aplicação proposta nesta tese, uma vez que as concentrações de microrganismos presentes em alimentos tendem a ser bem menores que aquelas testadas *in vitro* no ensaio de zona de inibição.

4. CONCLUSÕES

A etapa inicial deste estudo envolveu o preparo e a otimização de materiais à base de quitosana, gelatina e extrato de casca de romã, os quais serão caracterizados no capítulo a seguir e aplicados como revestimentos naturais de morangos no capítulo 4. O DCCR adotado para a determinação das composições de cada um dos componentes dos revestimentos apontou para quantidades menores de quitosana como sendo mais adequadas para minimizar a viscosidade das misturas e a solubilidade dos filmes, enquanto os estudos *in vitro* sugeriram que concentrações mais elevadas de quitosana seriam necessárias para a segurança microbiológica dos revestimentos, o que levou à escolha da composição contendo 0,8% de quitosana, 0,2% de gelatina e 1 mg g⁻¹ de extrato de casca de romã para a continuidade do estudo.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO DOS REVESTIMENTOS POLIMÉRICOS DE QUITOSANA, GELATINA E EXTRATO DE CASCA DE ROMÃ

1. INTRODUÇÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados da caracterização da formulação polimérica de quitosana, gelatina e extrato de casca de romã otimizada no capítulo anterior. A maior parte dos resultados aqui apresentados também faz parte do artigo intitulado “*Central composite design optimization of active and physical properties of food packaging films based on chitosan/gelatin/pomegranate peel extract*”, que foi publicado no periódico internacional “*Food Packaging and Shelf Life*” (fator de impacto = 8,0 em 2023) (BERTOLO *et al.*, 2022). Este artigo pode ser visualizado no Anexo I desta tese. Além disso, estes resultados também foram utilizados para o depósito da patente BR 10 2021 026404: “Composições poliméricas com propriedades antioxidantes e antimicrobianas para revestimento de frutas, método de preparação do revestimento e seu uso” (BERTOLO *et al.*, 2021b) (Anexo II).

Assim, o objetivo principal deste capítulo foi o de caracterizar a formulação otimizada contendo 0,8% de quitosana, 0,2% de gelatina e 1 mg g⁻¹ de extrato de casca de romã em comparação com uma formulação de mesma composição, mas sem extrato, de forma a se elucidar os efeitos dos compostos fenólicos sobre as propriedades da mistura polimérica. Sendo assim, os objetivos específicos deste capítulo são: (i) o estudo reológico das formulações com e sem extrato; (ii) a avaliação das propriedades espectroscópicas e morfológicas dos filmes provenientes dessas soluções; (iii) a avaliação das propriedades físico-químicas de solubilidade, intumescimento e hidrofiliabilidade, propriedades de barreira à luz e propriedades mecânicas dos filmes; (iv) a avaliação das propriedades ativas (antioxidante e antimicrobiana) das formulações; e (v) o estudo da liberação do extrato da matriz polimérica em diferentes condições experimentais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo dos filmes QG e QGE

Uma vez tendo sido determinada a proporção ideal entre os polímeros da mistura de quitosana (Q) e gelatina (G), bem como a concentração de extrato de casca de romã (E) que levou aos resultados mais satisfatórios dentre as respostas avaliadas no planejamento experimental do capítulo anterior, deu-se sequência à caracterização dessa amostra, denominada QGE (amostra 3 da Tabela 2.2). Como forma de comparação, também foi preparada uma mistura QG, mantendo as proporções entre os polímeros, mas sem a adição do extrato de casca de romã. É importante ressaltar que a essa amostra foi adicionada uma solução etanólica 60% (v/v), sem o extrato, apenas para se manter as concentrações dos polímeros da amostra QGE. As amostras foram pesadas em moldes de Teflon® com controle de gramatura e colocadas por 1 semana ao abrigo da luz, para a formação dos filmes. Uma vez secos, os filmes foram estabilizados em uma umidade relativa (UR) de 75% com solução saturada de cloreto de sódio a 25 °C em uma câmara com higrômetro.

2.2 Estudo reológico

A fim de se determinar a região viscoelástica das misturas QG e QGE, os primeiros ensaios reológicos conduzidos no reômetro de deformação controlada AR-1000N (TA Instruments) foram de oscilação de stress, com temperatura e frequência constantes (25 °C e 1,0 Hz, respectivamente), variando-se a tensão de oscilação de 0,05 a 500 Pa e obtendo-se assim os módulos elástico (G') e viscoso (G'') em função da % de deformação.

Os módulos G' e G'' também foram avaliados em função da frequência angular aplicada, de 0,1 a 100 rad s^{-1} , a 25 °C e 10% de deformação e em função da temperatura, de 25 a 75 °C, com uma rampa de 5 °C min^{-1} , a 1,0 Hz de frequência e 10% de deformação. Por fim, foram conduzidos ensaios de fluidez, variando-se a tensão de cisalhamento de 0,5 a 1000 s^{-1} em diferentes temperaturas: 15, 25, 35, 45 e 55 °C. Todos os ensaios reológicos foram conduzidos em triplicata.

As curvas obtidas nas diferentes temperaturas foram modeladas de acordo com o modelo de Cross (Equação (2.6)). A viscosidade das amostras foi então relacionada com a temperatura de estudo por meio da equação de Arrhenius

(Equação (3.1)). Nessa equação, E_a é a energia de ativação, R é a constante universal dos gases perfeitos ($8,3144 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) e A é uma constante, relacionada à frequência de colisões entre as moléculas. O coeficiente angular das retas de $\ln \eta_0$ versus $1/T$ corresponde a $-E_a/R$.

$$\ln \eta_0 = \ln A - \left(\frac{E_a}{R}\right) \times \left(\frac{1}{T}\right) \quad \text{Equação (3.1)}$$

2.3 Análises espectroscópicas e morfológicas

Os espectros FTIR-ATR dos filmes QG e QGE foram obtidos de 4000 a 650 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} e acumulando 16 varreduras, conforme descrito na seção 2.2.1 do capítulo 2. Os espectros Raman de QG e QGE foram obtidos em um microscópio WITec Alpha 300 RAS (WITec), por excitação em 532 nm e com detecção de 150 a 3500 cm^{-1} . Uma objetiva de ampliação de 20x (Zeiss) coletou os espectros, que foram processados com os *softwares* WITec Project FOUR e Origin 2016. Todos os ensaios foram conduzidos no Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP).

As análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes foram conduzidas em sua superfície, bem como em sua seção transversal (por meio da fratura dos filmes). Os filmes foram colados em *stubs* com uma fita condutora de carbono e recobertos com uma camada de ouro em um metalizador Coating System Bal-Tec Med 020 (Bal-Tec). As condições experimentais foram: pressão na câmara de $2 \cdot 10^{-2} \text{ mbar}$, corrente de 60 mA e taxa de deposição de $0,60 \text{ nm s}^{-1}$. O equipamento utilizado foi o Zeiss Leo 440 com detector Oxford (modelo 7060) e feixe de elétrons de 20 kV, que está alocado na Central de Análises Químicas do IQSC/USP.

2.4 Solubilidade, intumescimento, teor de umidade e ângulo de contato

O teor de umidade dos filmes foi determinado por diferença de pesagem antes e após sua estabilização em 15% de UR, em uma câmara de umidade de controlada com $\text{NaOH}_{(s)}$, por 7 dias. Sua % de intumescimento foi determinada em triplicata a partir do método adaptado de Peng, Wu e Li (2013), que envolveu a imersão dos filmes em 10 mL de água deionizada e pesagens em intervalos de tempo específicos (30 min, 1, 2, 4 e 6 h). Da mesma forma, avaliou-se a solubilidade dos mesmos pela

diferença de massa entre os filmes úmidos e secos, conforme procedimento descrito na seção 2.5.3 do capítulo 2, para os tempos de 30 min, 1, 2, 4 e 6 h.

Para se determinar o grau de hidrofiliabilidade dos filmes, as medidas de ângulo de contato foram feitas segundo procedimento adaptado de Rodrigues *et al.* (2020) em um goniômetro CAM200 (KSV Instruments), equipamento alocado no Grupo de Polímeros “Prof. Bernhard Gross” do IFSC/USP. Para tanto, gotículas de água de 5 μ L foram depositadas na superfície dos filmes, em triplicata, utilizando-se uma microseringa de precisão. As medições do ângulo de contato foram feitas em 10 *frames* a cada 1 s. Os ângulos de contato em ambos os lados da queda da gotícula foram calculados com o *software* CAM 2008, usando o método de ajuste de Young/Laplace. Os valores médios dos ângulos de contato foram reportados no final de 10 s.

2.5 Propriedades ópticas e ensaios mecânicos

As propriedades ópticas dos filmes foram determinadas com um colorímetro HunterLab (HunterLab, equipado com um iluminante padrão C e sistema CIELAB), em relação à sua luminosidade (L^*), cromaticidade (C^*), ângulo de tonalidade ou ângulo Hue (h°) e diferença total de cor (ΔE). As propriedades de barreira óptica contra o UV e a luz visível foram obtidas em espectrômetro UV-vis (Shimadzu 1600), de 250 a 800 nm. As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas por ensaios de tração *versus* deformação seguindo o método D882-12 (ASTM, 2012). O equipamento utilizado foi um analisador de textura TA. XT Plus (Stable Micro Systems), da EMBRAPA Instrumentação. Os ensaios foram conduzidos em quintuplicata.

2.6 Propriedades ativas

Em relação às propriedades antioxidantes, o conteúdo total de fenólicos das misturas QG e QGE foi determinado de acordo com o método de Folin, seguindo o mesmo procedimento descrito na seção 2.5.1 do capítulo 2. O IC_{20} das amostras, ou seja, a concentração das misturas necessária para inibir 20% do radical DPPH colocado em contato com elas, foi determinado segundo o procedimento descrito na seção 2.2.3 do capítulo 2, variando-se a concentração das misturas QG e QGE de 20 a 80 $mg mL^{-1}$.

Em relação às propriedades antimicrobianas, o extrato de casca de romã e as misturas QG e QGE tiveram sua concentração inibitória mímica (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) determinadas contra cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella enterica enteritidis* ATCC 13076) com o ensaio de micro diluição em caldo, de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018).

Os materiais foram diluídos em série em uma placa de 96 poços com caldo Müller Hinton (MHB, pH 5,5, Himedia), sendo as concentrações iniciais de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o extrato e de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ para QG e QGE. Uma suspensão padrão de 0,5 McFarland ($1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC) mL^{-1}) das culturas foi preparada em MHB e diluída para atingir uma população final de 5×10^5 UFC mL^{-1} por poço da microplaca. As placas foram incubadas a 37°C por 18 h e sua densidade óptica foi determinada em 600 nm (leitor de microplacas Perkin Elmer EnSpire). Então, 10 μL das soluções dos poços sem crescimento aparente foram colocados em placas de ágar MHB e incubados por 24 h. A concentração mais baixa da amostra sem crescimento microbiano aparente foi identificada como CIM e a concentração mais baixa sem células viáveis detectáveis foi identificada como CBM. Os ensaios foram conduzidos no Grupo de Biotecnologia Microbiana do IQSC/USP.

2.7 Estudo de lixiviação dos filmes em função do pH e temperatura

A lixiviação do filme QGE em diferentes pH e temperaturas foi avaliada pelo monitoramento da liberação do extrato de casca de romã, por meio de leituras de absorvância em 280 nm, em um espectrofotômetro UV-Vis (U-300, Hitachi). Para tanto, pedaços de $2,25 \text{ cm}^2$ dos filmes foram colocados em 2 mL de soluções com pH 3, 7 e 11. A leitura das soluções em 280 nm se deu após 2, 4, 6, 8 e 24 h de liberação. Após cada leitura, as alíquotas eram retornadas aos recipientes contendo os filmes. Para a determinação da concentração de extrato de casca de romã liberado em cada pH, foram construídas três curvas de calibração do extrato, variando-se sua concentração de 15,62 a $62,50 \mu\text{g mL}^{-1}$. No caso da temperatura, os filmes foram colocados em 2 mL de tampão de ácido cítrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e Na_2HPO_4 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$), pH 3,4, e mantidos a 4, 25 e 37°C . As leituras de absorvância foram tomadas após 2 e 24 h de liberação. A concentração de extrato liberado foi

determinada com o auxílio de uma curva de calibração do extrato em tampão pH 3,4. Em todos os casos, as medidas foram feitas em triplicata.

2.8 Análise estatística

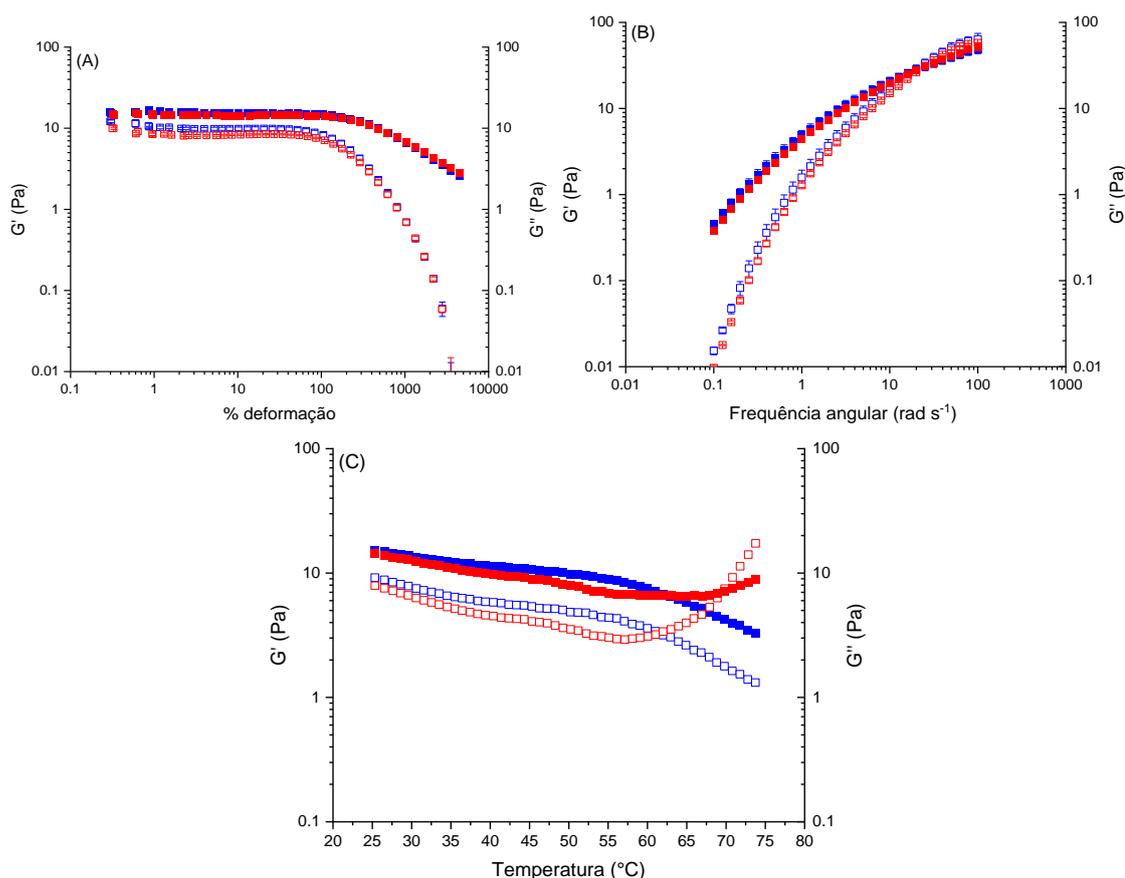
O teste de Shapiro-Wilk foi adotado para a análise de parametricidade e o programa ActionStat (Estatcamp, 2014, São Carlos, SP, Brasil) foi utilizado para avaliar a homogeneidade dos dados; a diferença estatística entre as amostras foi determinada pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Estudo reológico

O estudo reológico das misturas QG e QGE teve início com a varredura dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') em função da % de deformação aplicada. A partir dessa varredura, pode-se determinar a região viscoelástica linear (RVL), ou seja, o intervalo de deformações aplicadas no qual os módulos permanecem constantes; saindo da RVL, os módulos tendem a diminuir de acordo com o aumento na % de deformação (FADAVI *et al.*, 2014). A Figura 3.1(A) mostra as curvas médias de deformação obtidas para QG e QGE. Em ambas as misturas, $G'' > G'$, indicando a predominância do módulo viscoso sobre o elástico.

Figura 3.1. Módulos G' (símbolo aberto) e G'' (símbolo fechado) das misturas QG (■) e QGE (■) em função de: (A) % de deformação, (B) frequência angular e (C) temperatura.



Fonte: autoria própria.

A partir dessas curvas, determinaram-se os parâmetros apresentados na Tabela 3.1. O primeiro deles, γ_L , é a deformação crítica das misturas, ou seja, a maior % de deformação a qual as misturas podem ser submetidas antes de saírem

da RVL. Quanto maior o valor deste parâmetro, mais extensa é a RVL, indicativo de uma mistura com uma força estrutural maior (FADAVI *et al.*, 2014). O segundo parâmetro, G'_{RVL} , é o valor de módulo elástico relativo a γ_L , ou seja, o valor de G' no limite da RVL.

Tabela 3.1. Parâmetros obtidos pelos ensaios reológicos de deformação e de frequência para as amostras QG e QGE.

Parâmetros	QG	QGE
γ_L (%)	65,67 ± 2,76 ^a	68,47 ± 1,33 ^a
G'_{RVL} (Pa)	9,30 ± 0,56 ^a	7,94 ± 0,14 ^b
$\tan\delta$	1,63 ± 0,02 ^b	1,80 ± 0,02 ^a
$G''-G'$ (Pa)	5,52 ± 0,15 ^a	5,99 ± 0,22 ^a
$\omega_{cruzamento}$ (rad s ⁻¹)	19,49 ± 1,05 ^b	23,74 ± 0,82 ^a
$G'_{cruzamento}$ (Pa)	27,78 ± 2,47 ^a	29,87 ± 0,55 ^a

Fonte: autoria própria. Em uma mesma linha, amostras com letras sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

Observou-se que a adição do extrato de casca de romã ao revestimento levou a uma tendência de aumento de γ_L , indicativo de que ele pode estar reforçando a estrutura polimérica e tornando-a menos suscetível aos efeitos da deformação aplicada. Em um estudo prévio, Bertolo *et al.* (2020) também observaram esse efeito do extrato de casca de romã sobre a arquitetura das moléculas poliméricas em suas misturas de quitosana e gelatina, reportando uma relação linear entre o valor de γ_L e a concentração de extrato (de 50 a 200 mg mL⁻¹).

Da mesma forma, é claro o efeito do extrato sobre o caráter elástico das misturas, que apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao valor de G'_{RVL} . Esse efeito da adição do extrato pode também ser percebido pelos valores de fator de perda ($\tan\delta$) das misturas. Como esse parâmetro é a razão entre G'' e G' , valores maiores de $\tan\delta$ podem ser reflexo de uma diminuição do caráter elástico da amostra, com um conseqüente aumento do comportamento viscoso. No caso de QG e QGE, $\tan\delta$ aumentou com a adição do extrato. Esse parâmetro também permite classificar as amostras nos ensaios oscilatórios: amostras com $\tan\delta > 1$ podem ser classificadas como viscosas, já que $G'' > G'$. Além disso, se $\tan\delta > 0,1$ as amostras encontram-se em um estado intermediário entre um gel real e uma solução polimérica concentrada, o que se aplica às misturas deste estudo (MANDALA; SAVVAS; KOSTAROPOULOS, 2004).

Por fim, observando-se a diferença entre os módulos G'' e G' na Tabela 3.1, pode-se confirmar que a adição do extrato aumentou o valor de $G''-G'$, acentuando a diferença entre os módulos devido ao aumento do comportamento viscoso das misturas.

As curvas médias da varredura dos módulos em função da frequência angular podem ser observadas no gráfico da Figura 3.1(B). Assim como nos ensaios de oscilação, $G'' > G'$ para ambas as misturas. Entretanto, foi observado um cruzamento entre os módulos no final da análise, com predominância do módulo elástico. Tal comportamento é típico de soluções poliméricas concentradas (como já havia sido sugerido pelo parâmetro $\tan\delta$), uma vez que em soluções diluídas os módulos apenas se aproximariam sem se cruzar e em géis reais G' seria maior que G'' em todo o intervalo de frequência estudado (NAJI-TABASI; MOHAMMAD; RAZAVI, 2017; STEFFE, 1996).

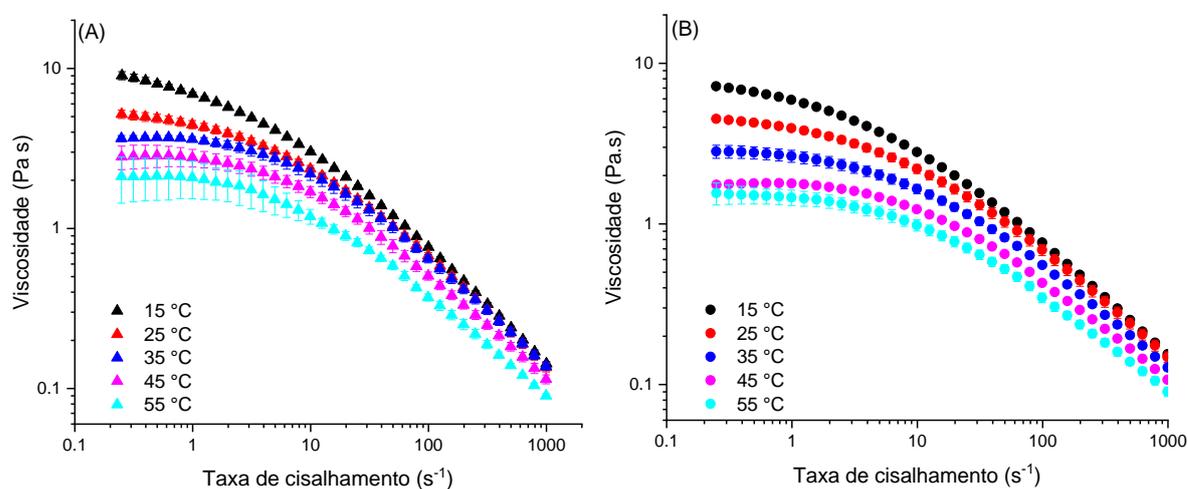
As mudanças observadas para os parâmetros relativos ao ensaio de frequência angular, $\omega_{\text{cruzamento}}$ e $G'_{\text{cruzamento}}$, indicam que a adição do extrato de casca de romã ao revestimento atrasou significativamente a inversão entre os módulos em cerca de 4 rad s^{-1} , sendo que o valor do módulo elástico no cruzamento foi aproximadamente 2 Pa maior que no caso de QG. Assim, os resultados do ensaio de frequência concordam com os do ensaio de deformação, uma vez que sugerem que o extrato de casca de romã pode estar formando novas interações com a mistura polimérica, alterando-a e reforçando sua resistência em mudar frente à deformação e à frequência aplicadas.

Outra evidência disso pode ser observada no gráfico da Figura 3.1(C), que mostra o comportamento dos módulos em função da temperatura. Até aproximadamente $55 \text{ }^\circ\text{C}$ os módulos G'' e G' diminuíram com o aumento da temperatura, comportamento típico de polímeros. Entretanto, enquanto para QG esse perfil de diminuição dos módulos foi observado até o final do ensaio, para QGE os módulos passaram a subir por volta dos $60 \text{ }^\circ\text{C}$, se cruzando em $63,80 \pm 4,81 \text{ }^\circ\text{C}$. Essa inversão entre os módulos pode ser explicada pela redução das interações de hidrogênio existentes entre a rede polimérica e as moléculas de água em altas temperaturas, devido à energização dessas moléculas. Assim, a interação polímero-polímero é reforçada, levando a um aumento da elasticidade da solução e ao consequente cruzamento dos módulos (TANG *et al.*, 2007). Como em QGE a

presença do extrato de casca de romã já havia levado a uma diminuição das interações poliméricas com a água (devido às novas interações com o extrato), tal inversão entre os módulos devido ao aumento da temperatura foi facilitada, motivo pelo qual ela foi observada para essa mistura.

Pode-se concluir o estudo reológico das misturas QG e QGE com os ensaios de fluxo dessas amostras, os quais avaliaram o comportamento de sua viscosidade em função da taxa de cisalhamento, em 5 diferentes temperaturas (Figura 3.2). As misturas QG e QGE apresentaram, em todas as temperaturas estudadas, uma diminuição em sua viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, um comportamento típico de polímeros chamado de pseudoplasticidade. Este comportamento ocorre porque as moléculas poliméricas, que na ausência de cisalhamento estão distribuídas randomicamente na rede formada, tendem a se ordenar quando submetidas a uma taxa de cisalhamento crescente, se orientando na direção do cisalhamento aplicado, o que diminui sua viscosidade (MANDALA; SAVVAS; KOSTAROPOULOS, 2004).

Figura 3.2. Viscosidade em função da taxa de cisalhamento em diferentes temperaturas para: (A) QG e (B) QGE.



Fonte: autoria própria.

O parâmetro η_0 é representativo da viscosidade inicial das misturas, quando as moléculas poliméricas ainda estão distribuídas de forma randômica. Este parâmetro apresentou uma tendência de queda com o aumento da temperatura, tanto para QG quanto para QGE (Tabela 3.2). η_0 foi significativamente menor para QGE nas três primeiras temperaturas estudadas (15, 25 e 35 °C), o que mostra que a adição do extrato de casca de romã diminuiu a viscosidade inicial da rede polimérica.

Tabela 3.2. Parâmetros obtidos pelos ensaios reológicos de fluxo para as amostras QG e QGE.

Amostra	T (°C)	η_0 (Pa s)	k (s)	n	Ea (kJ mol ⁻¹)
QG	15	10,10 ± 0,53 ^a	0,321 ± 0,038 ^a	0,730 ± 0,004 ^a	28,01 ± 2,57 ^a
	25	5,58 ± 0,37 ^a	0,152 ± 0,009 ^a	0,734 ± 0,006 ^a	
	35	3,91 ± 0,18 ^a	0,076 ± 0,012 ^a	0,809 ± 0,002 ^a	
	45	3,01 ± 0,47 ^a	0,075 ± 0,015 ^a	0,825 ± 0,038 ^a	
	55	2,34 ± 0,86 ^a	0,094 ± 0,060 ^a	0,795 ± 0,059 ^a	
QGE	15	8,05 ± 0,30 ^b	0,238 ± 0,009 ^b	0,717 ± 0,001 ^b	32,91 ± 2,62 ^a
	25	4,87 ± 0,11 ^b	0,131 ± 0,019 ^a	0,709 ± 0,010 ^b	
	35	3,00 ± 0,29 ^b	0,076 ± 0,007 ^a	0,741 ± 0,035 ^b	
	45	1,86 ± 0,03 ^a	0,046 ± 0,002 ^a	0,832 ± 0,014 ^a	
	55	1,62 ± 0,21 ^a	0,058 ± 0,009 ^a	0,767 ± 0,026 ^a	

Fonte: autoria própria. Parâmetros obtidos a partir da modelagem das curvas de fluxo pelo modelo de Cross. Para uma mesma temperatura e um mesmo parâmetro (η_0 , k ou n), letras sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

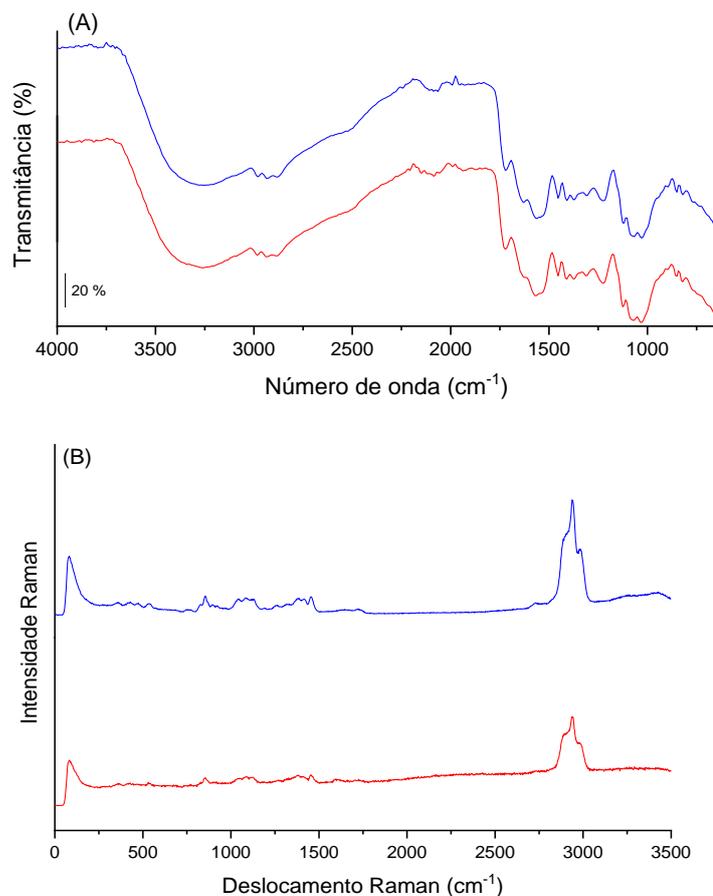
O segundo parâmetro apresentado na Tabela 3.2, k, é o chamado índice de consistência, relacionado ao platô Newtoniano das misturas. Quanto menor o valor de k, maior é a taxa de cisalhamento necessária para que a amostra supere seu platô Newtoniano e se torne pseudoplástica. Para ambas as misturas, k apresentou uma tendência clara de diminuição de acordo com o aumento da temperatura, fato que também pode ser observado nas Figuras 3.2(A) e 3.2(B), nas quais as curvas em temperaturas maiores apresentaram um platô mais extenso. Comparando-se QG e QGE em uma mesma temperatura, observa-se que a presença do extrato diminuiu o valor de k, tornando necessários valores maiores de cisalhamento para o início da pseudoplasticidade. Esse fato pode estar relacionado ao maior número de interações dos compostos fenólicos do extrato com a rede polimérica, o que a torna mais resistente ao cisalhamento aplicado, estendendo assim seu platô Newtoniano (TUDORACHE; TORDENAVE, 2019). Por fim, o parâmetro n, ou índice de taxa, é um parâmetro adimensional que permite classificar as amostras como pseudoplásticas ($0 < n < 1$) ou Newtonianas ($n > 1$). QG e QGE foram pseudoplásticas em todas as temperaturas analisadas e o aumento da temperatura levou ao aumento de n até a temperatura de 45 °C, ainda que não de forma estatisticamente significativa.

Por fim, para concluir os ensaios reológicos das misturas QG e QGE, foi calculada a energia de ativação das misturas. A energia de ativação pode ser

definida como a energia necessária para que as moléculas de um fluido se movimentem, em altas temperaturas, fazendo-o escoar. Quanto maior esse valor, maior a resistência do fluido ao escoamento, devido às interações moleculares mais fortes (ABBASTABAR *et al.*, 2015). Conforme observado na Tabela 3.2, a energia de ativação aumentou, ainda que não significativamente, de $28,01 \pm 2,57 \text{ kJ mol}^{-1}$ em QG para $32,91 \pm 2,62 \text{ kJ mol}^{-1}$ em QGE. Este é outro resultado que sugere que a adição dos fenólicos do extrato de casca da romã pode estar tornando a rede polimérica de quitosana e gelatina mais resistente ao cisalhamento aplicado.

3.2 Análises espectroscópicas e morfológicas

A Figura 3.3(A) mostra os espectros FTIR-ATR obtidos para os filmes QG e QGE. Uma diferença entre as amostras pode ser observada na região de 3350 cm^{-1} , característica do estiramento das ligações N-H dos grupos amino da quitosana e da amida A da gelatina. No caso de QGE, observou-se um leve alargamento da banda nesta região, devido ao estiramento das ligações O-H dos compostos fenólicos do extrato, confirmando mais uma vez sua incorporação à matriz polimérica. As bandas representando as amidas I e II da quitosana e a amida I da gelatina aparecem em torno de 1600 cm^{-1} ; as três bandas próximas entre 1000 e 1100 cm^{-1} referem-se às ligações C-O-C da quitosana, bem como às ligações N-H, C-H e C-C-N do extrato e dos polímeros (BERTOLO *et al.*, 2020).

Figura 3.3. (A) espectros FTIR-ATR e (B) espectros Raman dos filmes QG (—) e QGE (—).

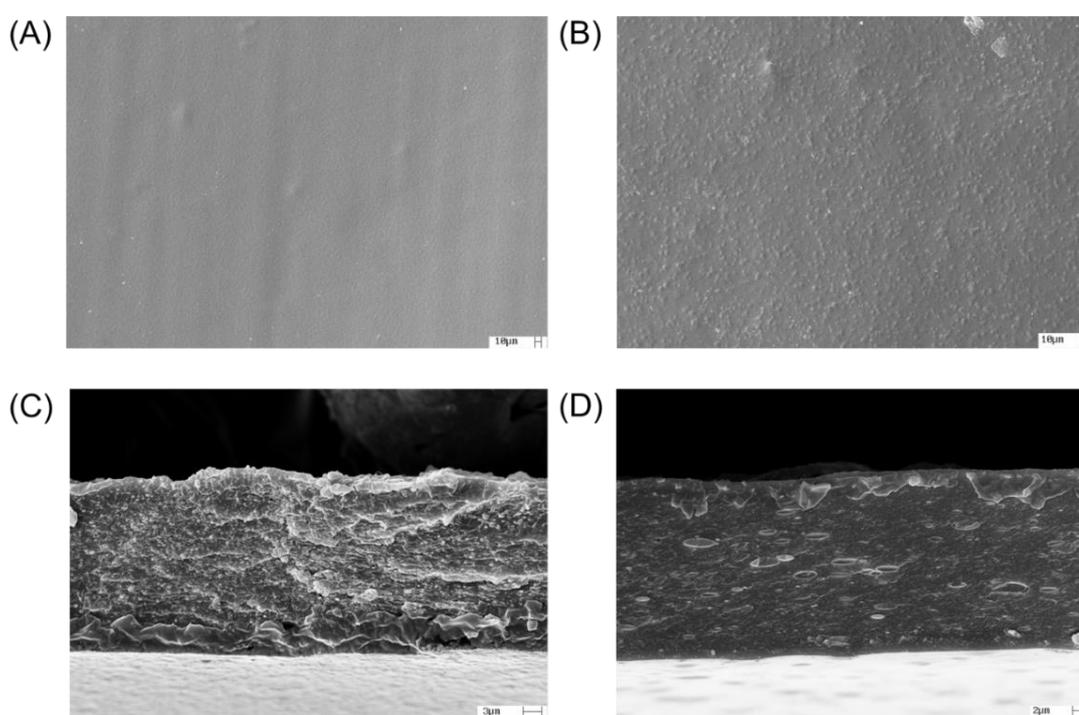
Fonte: autoria própria.

Os espectros Raman dos filmes (Figura 3.3(B)) mostraram um pico de intensidade máxima localizado em torno de 2940 cm⁻¹, típico de polímeros (vibrações C-H). Também foram observados picos nas regiões de 860 (vibrações C-C), 1080 (vibrações das ligações C-N e C-O-C) e 1455 cm⁻¹ (deformações angulares simétricas no plano CH₂, ligações C-H e O-H) (EDDYA; TBIB; HAMI, 2020; FRUSHOUR; KOENIG, 1975). Os resultados espectroscópicos confirmam a interação entre o extrato e os polímeros que havia sido apontada pelos ensaios reológicos.

A Figura 3.4 mostra as imagens por MEV das superfícies (A e B) e das superfícies de secção transversal (C e D) dos filmes QG e QGE. QG apresentou uma superfície lisa, sem precipitados visíveis. A adição do extrato em QGE levou a uma morfologia superficial diferente, com a presença visível do extrato distribuído por toda a superfície. As imagens transversais também mostram como o extrato se comporta na matriz polimérica, pois a estrutura compacta observada para QG

mudou para uma estrutura menos compacta com aglomerados de extrato. O extrato e sua natureza semi-polar, bem como o fato de estar solubilizado em etanol, podem explicar os agregados e pontos de cristalização observados nas imagens transversais. As diferenças morfológicas observadas para os filmes podem impactar significativamente suas características relacionadas à água, bem como suas propriedades reológicas e mecânicas.

Figura 3.4. Imagens de MEV das superfícies de (A) QG e (B) QGE, ambas com aumento de 500 x; imagens de MEV das superfícies de secção transversal de (C) QG e (D) QGE, ambas com aumento de 5.000 x.



Fonte: autoria própria.

3.3 Solubilidade, intumescimento, teor de umidade e ângulo de contato

O teor de umidade dos filmes QG e QGE não apresentou diferenças estatísticas significativas e não alcançou 10% em ambos os casos, após 7 dias em umidade relativa controlada de 15% (Tabela 3.3). A solubilidade e o intumescimento dos filmes são duas propriedades importantes a serem estudadas, quando se pensa em sua aplicação como revestimento e na manutenção de sua integridade quando em contato com a água. Enquanto a solubilidade está relacionada à natureza mais hidrofóbica ou hidrofílica dos filmes e à sua afinidade com as moléculas de água, o intumescimento envolve processos mais complexos, como a difusão da água entre as cadeias poliméricas, a ionização de grupos aminos e carboxílicos e a

consequente desassociação de ligações iônicas e de hidrogênio entre as cadeias, bem como a relaxação polimérica (MATHEW; BRAHMAKUMAR; ABRAHAM, 2006).

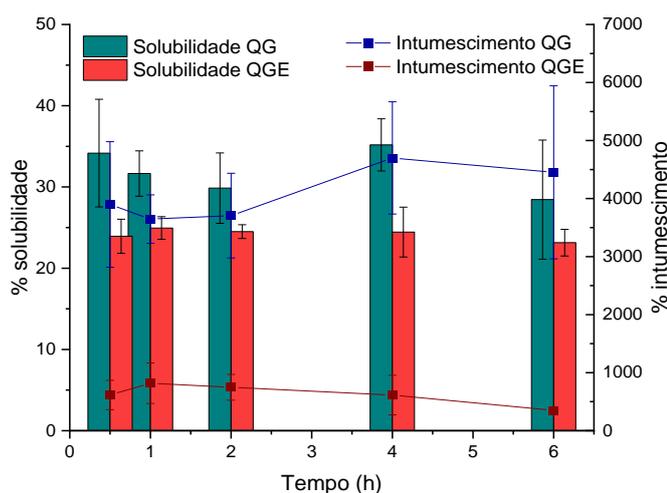
Tabela 3.3. Solubilidade, intumescimento, teor de umidade e ângulo de contato para os filmes QG e QGE.

Filme	Solubilidade* (%)	Intumescimento* (%)	Umidade (%)	Ângulo de contato (°)
QG	28,45 ± 7,33 ^a	4453,13 ± 1490,67 ^a	8,01 ± 1,54 ^a	109,76 ± 6,36 ^a
QGE	23,15 ± 1,63 ^a	350,64 ± 28,12 ^b	9,28 ± 2,06 ^a	89,24 ± 2,01 ^b

Fonte: autoria própria. Em uma mesma coluna, amostras com letras sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$). * Valores obtidos após 6 h de ensaio.

A solubilidade e o intumescimento dos filmes QG e QGE foram avaliados em função do tempo (0,5, 1, 2, 4 e 6 h). A Figura 3.5 mostra os resultados obtidos para ambos os ensaios. De maneira geral, a amostra QGE apresentou uma solubilidade estável ao longo do tempo, nunca superior a 25%. A amostra QG, por sua vez, apresentou variações entre 28,45 e 35,18%, devido principalmente ao intumescimento rápido dos filmes em água, que assumiram a forma de um gel e perderam sua estrutura definida. Kaya *et al.* (2018) reportaram resultados semelhantes de diminuição da solubilidade de filmes de quitosana com a adição de extrato de *Berberis crataegina* devido às interações entre os compostos fenólicos com as cadeias poliméricas.

Figura 3.5. Perfis de solubilidade e intumescimento dos filmes QG e QGE ao longo do tempo.



Fonte: autoria própria.

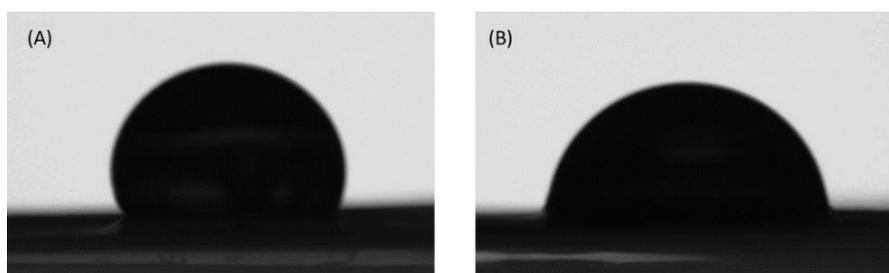
O intumescimento dos filmes QG e QGE foi rápido e se estabilizou logo depois de 30 min, com % significativamente diferentes entre as amostras ($p \leq 0,05$), sendo que os filmes sem extrato intumesceram cerca de 13 vezes mais que os filmes QGE

(Tabela 3.3). Di Pierro *et al.* (2006) reportaram que essa propriedade está relacionada ao número de interações intermoleculares existentes na estrutura dos filmes poliméricos; dessa forma, pode-se dizer que os resultados encontrados para QG e QGE são condizentes, uma vez que a adição dos fenólicos do extrato de casca de romã diminuiu significativamente a capacidade de intumescimento dos filmes de quitosana e gelatina, devido ao aumento do número de interações intermoleculares entre o extrato e os polímeros.

Em relação aos resultados de ângulo de contato da água na superfície dos filmes, a adição do extrato levou a uma diminuição significativa do ângulo de contato na superfície do filme QGE, diminuindo a hidrofobicidade da matriz polimérica de quitosana e gelatina. Ângulos de contato $> 90^\circ$ são característicos de superfícies hidrofóbicas, e são cruciais do ponto de vista tecnológico, para a aplicação dos filmes como revestimentos de alimentos.

A diminuição da hidrofobicidade dos filmes após a adição do extrato está relacionada ao aumento de sua molhabilidade devido à natureza mais hidrofílica dos compostos fenólicos do extrato. Kaya *et al.* (2018) reportaram resultados similares para o ângulo de contato da água em seus filmes de quitosana incorporados com extrato de *Berberis crataegina*, bem como Ramírez *et al.* (2012), para filmes à base de quitosana incorporados com extrato de folhas de murta (*Ugni molinae* Turcz). Tal evidência de aumento da molhabilidade também pode ser notada na Figura 3.6, que mostra o perfil da gota de água sobre a superfície dos filmes. Apesar da diminuição do valor médio do ângulo de contato em QGE, entretanto, pode-se dizer que o filme continuou apresentando uma superfície predominantemente hidrofóbica (ângulo de contato $\sim 90^\circ$).

Figura 3.6. Perfis de molhabilidade da gota de água sobre a superfície de: (A) QG e (B) QGE.



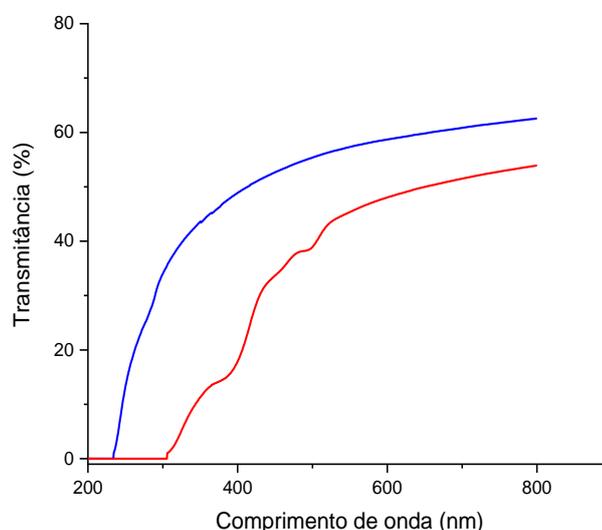
Fonte: autoria própria.

3.4 Propriedades ópticas e ensaios mecânicos

As propriedades ópticas de filmes de embalagem ou de revestimentos são importantes quando se tenta prever seu comportamento como barreiras à passagem de luz, ou quando se tenta prever se seu uso afetará as características visuais do alimento. Os parâmetros de cor obtidos para os filmes QG e QGE encontram-se na Tabela 3.4. A adição do extrato diminuiu significativamente o parâmetro L^* (luminosidade), indicando que a incorporação dos fenólicos levou a filmes de quitosana/gelatina mais escuros. Yuan *et al.* (2016) também observaram diminuição da luminosidade em seus filmes de quitosana com carvacrol e extrato de casca de romã. O ângulo Hue (h°), atributo qualitativo da cor, também diminuiu significativamente, o que indica que o extrato deslocou a coloração dos filmes da região do verde (180°) para a região do amarelo (90°) (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2020). A cromaticidade (C^*) e a diferença de cor total (ΔE), por sua vez, aumentaram de forma significativa ($p \leq 0,05$) de QG para QGE, refletindo mais uma vez a capacidade do extrato em alterar a cor da matriz polimérica de quitosana e gelatina.

A porcentagem de transmitância de luz nas regiões do UV e do visível foi avaliada para os filmes (Figura 3.7). Quanto menor a transmitância na região do UV, melhor a capacidade do filme em proteger os alimentos dos processos foto-oxidativos induzidos pela luz, que podem afetar seu sabor, aroma e composição nutricional (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2020).

Figura 3.7. Transmitância dos filmes QG (—) e QGE (—) na região do UV-Vis.



Fonte: autoria própria.

A adição do extrato reduziu em cerca de 30% a transmitância dos filmes de quitosana/gelatina em 400 nm. Mesmo na região do visível, os percentuais de transmitância encontrados para QGE foram menores do que para QG, estabilizando em torno de 50%. Assim, o extrato foi capaz não só de alterar a cor dos filmes, mas também de melhorar suas propriedades de barreira à passagem de luz visível e ultravioleta, devido às ligações insaturadas presentes em seus componentes (C=O, C=N, e C=C) que são capazes de absorver a radiação UV-Vis (HU *et al.*, 2020).

Materiais poliméricos com função de embalagem ou de revestimento também requerem propriedades mecânicas adequadas, que garantam ao máximo a preservação da integridade do alimento. As propriedades mecânicas dos filmes QG e QGE foram investigadas e são apresentadas na Tabela 3.4. A incorporação do extrato aumentou significativamente a resistência à tração (T) da matriz polimérica de quitosana e gelatina. A resistência à tração é um indicativo direto da coesividade e continuidade da matriz polimérica, e está relacionada às interações entre os polímeros que compõem o filme (ROY; RHIM, 2021; NARASAGOUDR *et al.*, 2020). Assim, o fato de a incorporação dos compostos fenólicos do extrato terem aumentado em cerca de 50% a resistência à tração dos filmes de quitosana e gelatina corrobora com a premissa de que estão sendo formadas interações entre estes compostos fenólicos e os polímeros.

Tabela 3.4. Propriedades ópticas (L*: luminosidade, h°: ângulo Hue, C*: cromaticidade e ΔE: diferença total de cor) e propriedades mecânicas (T: resistência à tração e ER: alongação na ruptura) dos filmes QG e QGE.

Parâmetro	QG	QGE
L*	92,34 ± 0,31 ^a	88,46 ± 0,16 ^b
h°	125,00 ± 2,72 ^a	94,90 ± 0,32 ^b
C*	1,98 ± 0,15 ^b	19,51 ± 0,46 ^a
ΔE	6,57 ± 0,31 ^b	21,65 ± 0,38 ^a
T (MPa)	30,00 ± 0,69 ^b	45,31 ± 1,08 ^a
ER (%)	4,28 ± 0,77 ^b	9,07 ± 2,01 ^a

Fonte: autoria própria. Diferentes letras sobrescritas em uma mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

A alongação na ruptura (ER) dos filmes também é apresentada na Tabela 3.4. É possível verificar que a % de aumento do comprimento dos filmes sob tração, no momento da ruptura, mais que dobrou com a adição do extrato de casca de romã à matriz polimérica. Este é outro indicativo de que o extrato afetou de forma positiva as

propriedades mecânicas dos filmes de quitosana e gelatina, reforçando-os e tornando-os mais elásticos, ao mesmo tempo. Tal resultado está de acordo com o observado para os valores de deformação crítica obtidos nos ensaios reológicos.

3.5 Propriedades ativas

O conteúdo total de fenólicos foi determinado para as misturas QG e QGE a partir do método de Folin-Ciocalteu. Os resultados obtidos foram de $14,7 \pm 1,5$ mg EAG mg^{-1} de mistura para QG e $206,80 \pm 20,23$ mg EAG mg^{-1} de mistura para QGE, o que demonstra o êxito na incorporação dos fenólicos do extrato na mistura polimérica.

Em relação ao ensaio antioxidante frente ao radical DPPH, a amostra QGE apresentou um valor de IC_{20} de 38 mg mL^{-1} de mistura, indicando que são necessários menos de 40 mg de revestimento para promover uma inibição de 20% do radical livre DPPH. A amostra QG não foi capaz de inibir o radical livre DPPH em nenhuma das concentrações testadas (20 a 80 mg mL^{-1}). Esses resultados são mais um indício da incorporação dos compostos ativos do extrato de casca de romã ao sistema polimérico de quitosana e gelatina, e de como isso aumentou o potencial antioxidante dos revestimentos preparados.

Em relação à atividade antimicrobiana, a CIM e a CBM do extrato e das soluções formadores dos filmes QG e QGE contra as bactérias *S. enteritidis* (Gram-negativa) e *S. aureus* (Gram-positiva) foram avaliadas e podem ser observadas na Tabela 3.5. O extrato foi capaz de inibir ambas as cepas bacterianas, mas nenhuma CBM foi observada nas concentrações testadas. Além disso, o extrato foi mais eficaz contra *S. aureus* (menor CIM), provavelmente devido às diferenças na estrutura da parede celular bacteriana: a membrana externa em bactérias Gram-negativas é menos permeável a compostos hidrofóbicos, como taninos e outros flavonoides possivelmente presentes no extrato (CELIKSOY; HEARD, 2021).

Tabela 3.5. CIM e CBM do extrato de casca de romã e das soluções formadoras dos filmes QG e QGE contra as bactérias *S. aureus* (Gram-positiva) e *S. enteritidis* (Gram-negativa).

Gram-positiva	Extrato	QG	QGE
CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	125	31,2	31,2
CBM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	>2000	31,2	31,2
Gram-negativa	Extrato	QG	QGE
CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	500	125	125
CBM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	>2000	250	>500

Fonte: autoria própria.

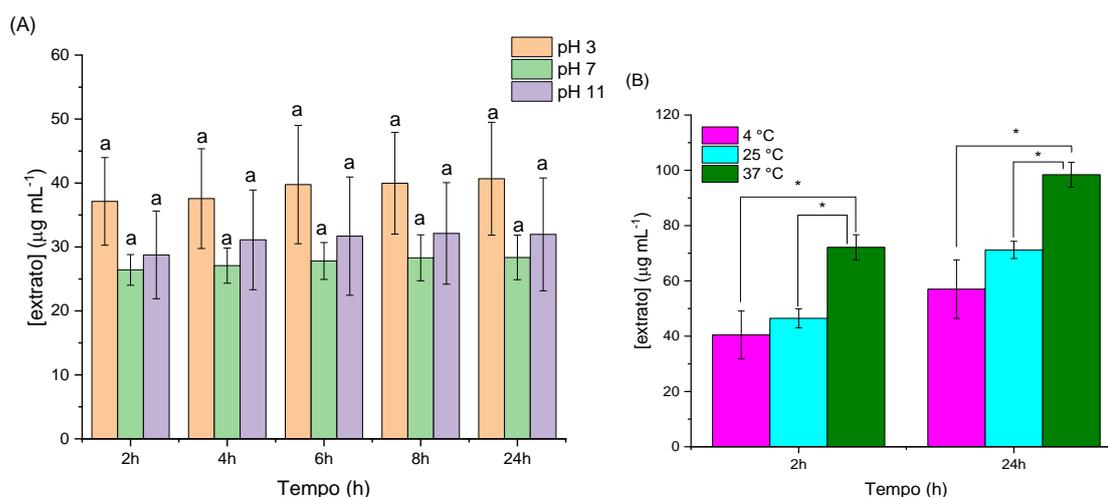
A solução formadora do filme QG apresentou notável atividade bactericida contra *S. aureus* e *S. enteritidis*, mostrando melhor eficácia para as bactérias Gram-positivas. QGE e QG tiveram os mesmos valores de CIM e CBM para *S. aureus*, porém QGE não apresentou efeito bactericida ($\text{CBM} > 500 \mu\text{g mL}^{-1}$), nas concentrações testadas, contra *S. enteritidis*. Tal fato pode ser explicado pela reticulação entre os grupos hidroxila presentes no extrato e os grupos amino protonados da quitosana, o que diminuiu a interação do polissacarídeo com os alvos celulares de *S. enteritidis*. Além disso, a concentração do extrato na solução formadora do filme (1 mg g^{-1}) pode ter sido muito baixa para mostrar algum efeito aditivo. Embora QGE não tenha superado o desempenho bacteriostático e bactericida de QG, os resultados de atividade antimicrobiana foram muito promissores, indicando que o desempenho da atividade antimicrobiana das misturas poliméricas pode ser alcançado com concentrações baixas das mesmas.

3.6 Estudo de lixiviação dos filmes em função do pH e temperatura

O estudo de lixiviação dos filmes se deu por meio do monitoramento da concentração de extrato de casca de romã liberado ao longo do tempo, em diferentes pH (3, 7 e 11) e em diferentes temperaturas (4, 25 e 37 °C, em pH 3,4). A Figura 3.8 mostra os gráficos de barra com a concentração de extrato liberado ao longo do tempo. De maneira geral, a concentração de extrato liberado em função do pH do meio variou de 25 a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, não apresentando diferenças significativas em função do tempo ou do pH (Figura 3.8(A)). Apesar disso, os filmes em pH 3 apresentaram uma tendência maior de liberação, o que possivelmente está relacionado ao fato de ácidos orgânicos e fenólicos serem extraídos com mais facilidade quando o pH do meio é menor que seu pKa (FAN *et al.*, 2008; YU; ZHANG; CAO, 2007).

A concentração de extrato liberado também foi monitorada após 2 e 24 h com os filmes em diferentes temperaturas, e esta variou de 40 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 3.8(B)). Embora a temperatura de refrigeração (4 °C) e a temperatura de 25 °C não tenham apresentado diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$), os filmes que ficaram armazenados na estufa a 37 °C liberaram uma concentração de extrato significativamente maior ($p \leq 0,05$).

Figura 3.8. Gráficos de liberação do extrato de casca de romã pelo filme QGE em: (A) diferentes pH e (B) diferentes temperaturas.



Fonte: autoria própria. *Indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

Assim, os resultados de liberação mostram que as concentrações liberadas foram baixas quando comparadas à concentração inicial de extrato incorporada nos filmes (800 μg de extrato em 2,25 cm^2 de filme). A variação no pH liberou um máximo de 10% do extrato presente no filme (o correspondente a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de extrato em 2 mL de solução), e a variação na temperatura levou a uma liberação máxima de 200 μg (ou 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 2 mL de solução), relativa a menos de 25% do extrato presente na amostra.

4. CONCLUSÕES

Neste capítulo, o revestimento otimizado no capítulo anterior foi caracterizado quanto ao seu perfil espectroscópico, morfológico e reológico, os quais confirmaram a incorporação e as interações do extrato com a matriz polimérica. Em relação às propriedades dos filmes relacionadas à água, a presença do extrato de casca de romã mostrou-se positiva para a melhoria da molhabilidade, solubilidade e intumescimento dos filmes. O extrato também conferiu propriedade antioxidante aos revestimentos, o que pode atuar em conjunto com a atividade antimicrobiana intrínseca da quitosana na melhoria do controle de microrganismos pelos revestimentos. Além disso, o extrato de casca da romã melhorou as propriedades de barreira dos filmes contra a passagem de luz, bem como as suas propriedades mecânicas. A liberação do extrato pela matriz polimérica em função do pH foi baixa, atingindo cerca de 10% da quantidade de extrato presente no filme. Em suma, todos os resultados físico-químicos e ativos (antioxidantes e antimicrobianos) conduzidos com o material otimizado nesta etapa do estudo foram promissores para sua aplicação como revestimento natural de morangos, conforme será exposto no capítulo seguinte desta tese.

CAPÍTULO 4

PRESERVAÇÃO DOS ATRIBUTOS FÍSICO- QUÍMICOS, MICROBIOLÓGICOS, BIOATIVOS, SENSORIAIS E DO PERFIL DE VOLÁTEIS DE MORANGOS RECOBERTOS COM OS REVESTIMENTOS DE QUITOSANA, GELATINA E EXTRATO DE CASCA DE ROMÃ

1. INTRODUÇÃO

Neste capítulo, estão descritos a aplicação e os efeitos dos revestimentos desenvolvidos nos capítulos anteriores sobre as propriedades físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de morangos, ao longo de seu armazenamento refrigerado. Também são discutidos os efeitos dos revestimentos sobre a respiração dos frutos, seu perfil de compostos bioativos e seu perfil de compostos voláteis. Por fim, é apresentada uma estimativa dos custos para os revestimentos.

Os resultados apresentados neste capítulo da tese encontram-se em fase de submissão para publicação no periódico internacional *Food Chemistry* (fator de impacto = 9,231 em 2023), na forma do artigo intitulado: “*Improvement of the physical-chemical, microbiological, aromatic and sensory quality of strawberries covered with chitosan/gelatin/pomegranate peel extract-based coatings*”. Além disso, parte destes resultados também foram utilizados para o depósito da patente BR 10 2021 026404: “Composições poliméricas com propriedades antioxidantes e antimicrobianas para revestimento de frutas, método de preparação do revestimento e seu uso” (BERTOLO et al., 2021b) (Anexo II).

Sendo assim, os objetivos gerais deste capítulo foram aplicar os revestimentos poliméricos de quitosana/gelatina (QG) e quitosana/gelatina/extrato de casca de romã (QGE) em morangos, com a finalidade de estender sua vida de prateleira. Para isso, foram avaliados os parâmetros físico-químicos de perda de massa, cor, firmeza, teor de sólidos solúveis, acidez titulável e pH, bem como a respiração, o teor de compostos bioativos, a atividade antioxidante e o perfil de voláteis dos frutos ao longo de 12 dias de armazenamento refrigerado. Além disso, também foi avaliado o atraso no desenvolvimento de contaminações fúngicas nos morangos revestidos e não revestidos durante o armazenamento, bem como foi feita uma avaliação sensorial nos frutos recobertos e não recobertos. Finalmente, é apresentada uma estimativa de custo para os revestimentos utilizados nesta pesquisa.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Aplicação dos revestimentos nos morangos

Os revestimentos QG e QGE, preparados e caracterizados conforme descrito nos capítulos anteriores, foram aplicados em morangos para avaliar seus efeitos sobre a qualidade físico-química e microbiológica dos frutos. Para tanto, os morangos (cultivar Camino Real) foram adquiridos no dia imediatamente anterior à aplicação dos revestimentos e os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Tecnologia Pós-Colheita de frutas e hortaliças da EMBRAPA Instrumentação.

Antes da aplicação dos revestimentos, foi feita uma pré-seleção dos frutos, escolhendo-se aqueles com um estágio de maturação similar (de acordo com suas características físicas, como coloração). Todos os frutos selecionados foram sanitizados por 30 s em solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v), lavados com água corrente e secos sob fluxo de ar por 2 h. Em seguida, os morangos foram imersos nas soluções de revestimento por 2 min e o excesso das soluções de revestimento foi removido. Então, foi aplicada secagem a 25 °C até a manhã do dia seguinte. Os morangos do grupo controle (ou seja, sem revestimento), depois de sanitizados, foram mantidos por 2 min em água deionizada, para simular o tempo de aplicação dos revestimentos. Para as análises, os morangos foram armazenados, uma vez secos, em um expositor (7 ± 1 °C) dentro de caixas plásticas. A UR foi controlada, ficando entre 60-70% ao longo de todo o experimento. As medidas foram feitas durante o período de armazenamento dos frutos, nos dias 0, 3, 6, 9 e 12.

2.2 Parâmetros físico-químicos dos morangos

2.2.1 Perda de massa e contaminação fúngica

Para a determinação da perda de massa, os morangos ($n = 15$) foram pesados nos dias 0, 3, 6, 9 e 12 de armazenamento. A % de perda de massa foi calculada segundo a Equação (4.1), na qual m_0 é a massa dos frutos no dia 0, e m_t é a massa dos frutos em cada um dos demais dias de análise. Os morangos também foram avaliados visualmente quanto à presença e/ou ao crescimento de fungos nos dias 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12, e a % de contaminação foi calculada segundo a Equação (4.2).

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \times 100 \quad \text{Equação (4.1)}$$

$$\text{Contaminação (\%)} = \frac{n \text{ frutos contaminados}}{n \text{ inicial de frutos}} \times 100 \quad \text{Equação (4.2)}$$

2.2.2 Cor

A cor externa dos morangos foi avaliada em diferentes posições equatoriais dos frutos ($n = 15$) com um colorímetro Konica Minolta CR-400 (Konica Minolta), equipado com um iluminante padrão C e usando o sistema CIELAB ($L^* a^* b^*$). A luminosidade (L^*), a cromaticidade (C^*), o ângulo Hue (h°) e a diferença de coloração total (ΔE) foram calculados para cada um dos frutos em todos os dias de análise (0, 3, 6, 9 e 12). A diferença de coloração total (ΔE) foi calculada segundo a Equação (4.3), na qual t representa cada um dos dias de análise e 0 representa o dia inicial de análise dos frutos (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2022a).

$$\Delta E = \sqrt{(L_t^* - L_0^*)^2 + (a_t^* - a_0^*)^2 + (b_t^* - b_0^*)^2} \quad \text{Equação (4.3)}$$

2.2.3 Firmeza

A firmeza dos frutos foi avaliada com o uso de um texturômetro digital (TAXTplus Texture Analyzer, Stable Micro Systems Ltd.), equipado com uma sonda de 4 mm de diâmetro, velocidade de 10 mm s⁻¹, distância de penetração de 2 mm e área de contato de 12 mm². Os resultados foram expressos em Newtons (N), com a média de 3 penetrações na região distal de cada fruto, sendo $n = 10$ (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2022a).

2.2.4 Teor de sólidos solúveis, acidez titulável e pH

Os frutos ($n = 5$) foram homogeneizados com o auxílio de um *mixer* (PMX700, Philco, EUA) em cada dia de análise. A polpa obtida foi analisada em triplicata em um refratômetro digital (Atago RX-5000cx, Atago) para a determinação do conteúdo de sólidos solúveis (SS) dos frutos, expresso como °Brix (ou % sacarose). Para a determinação da acidez titulável dos frutos, cerca de 5 g da polpa obtida foram solubilizados em 25 mL de água deionizada e titulados em triplicata com NaOH 0,1 mol L⁻¹ utilizando fenolftaleína como indicador, sendo os resultados obtidos expressos em g de ácido cítrico para cada 100 g de fruto. O pH da polpa também foi medido em triplicata ao longo dos dias de análise, usando um pHmetro digital PHS-3B (Labnova) (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2022a).

2.3 Respiração

A taxa de respiração dos morangos revestidos e não revestidos ao longo do tempo foi determinada com um analisador de oxigênio e gás carbônico em *headspace* (modelo 6600, Illinois Instruments), de acordo com o procedimento descrito por Martins *et al.* (2014). Cerca de 300 g dos frutos foram colocados em frascos de vidro hermeticamente selados com septo de silicone e a amostragem de gás foi feita em triplicata, com uma agulha conectada aos frascos, após equilíbrio das amostras a 25 °C. A concentração de O₂ no *headspace* dos frascos foi determinada por um sensor paramagnético, e a de CO₂ por um sensor de infravermelho.

2.4 Compostos bioativos e atividade antioxidante

2.4.1 Conteúdo total de fenólicos

O conteúdo total de fenólicos dos morangos revestidos e não revestidos foi determinado segundo adaptações dos métodos propostos por Khodaei, Hamidi-Esfahani e Rahmati (2021) e Eshghi *et al.* (2014). Cerca de 2 g da polpa dos morangos obtida na seção 2.2.4 foram adicionados a 40 mL de metanol 50% (v/v), agitados manualmente por 30 s e centrifugados a 4000 rpm (centrífuga Himac C2 20B2, Hitachi) por 15 min, a 20 °C. Então, 50 µL do sobrenadante foram colocados para reagir com 50 µL do reagente de Folin-Ciocalteu por 5 min. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de carbonato de sódio 7% (g/g) e a absorbância foi lida (espectrofotômetro Thermo Scientific™) após 15 min em 725 nm. O procedimento foi feito em triplicata e os resultados foram expressos em mg EAG por 100 g de polpa.

2.4.2 Teor de antocianinas

O teor de antocianinas dos morangos foi determinado pelo método do pH diferencial, conforme metodologia descrita por Khodaei, Hamidi-Esfahani e Rahmati (2021). O sobrenadante obtido na seção 2.4.1 foi adicionado a soluções tampão pH 1,0 (ácido hidrocloreídrico e cloreto de potássio, 0,025 mol L⁻¹) e 4,5 (ácido acético e acetato de sódio, 0,4 mol L⁻¹), na proporção de 1:9. A absorbância das amostras foi lida em 510 e 700 nm, e o teor de antocianinas (estimado como equivalentes de cianidina-3-glicosídeo, em mg L⁻¹) foi calculado de acordo com a Equação (4.4).

$$\text{Teor de antocianinas (mg L}^{-1}\text{ de cianidina-3-glicosídeo)} = \frac{(A \times 449,2 \times FD \times 1000)}{(\epsilon \times l)}$$

Equação (4.4)

Na equação, 449,2 g mol⁻¹ corresponde à massa molar da cianidina-3-glicosídeo, *FD* é o fator de diluição das amostras, ϵ é o coeficiente de extinção molar da cianidina-3-glicosídeo (26.900 L mol⁻¹ cm⁻¹), 1 cm é o caminho óptico da cubeta e *A* é a absorbância, calculada de acordo com a Equação (4.5).

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH\ 1,0} - (A_{510} - A_{700})_{pH\ 4,5} \quad \text{Equação (4.5)}$$

Na equação, *A*₅₁₀ e *A*₇₀₀ correspondem às absorbâncias das amostras em 510 e 700 nm, respectivamente, de acordo com o pH do tampão utilizado para diluição das mesmas (1,0 e 4,5).

2.4.3 Teor de vitamina C

O teor de vitamina C (ácido ascórbico) dos morangos foi determinado pelo método de Tillmans, que se baseia na redução do indicador 2,6-diclorofenol indofenol (DCFI) pelo ácido ascórbico, segundo procedimento adaptado de Khodaei, Hamidi-Esfahani e Rahmati (2021). Cerca de 10 g da polpa obtida na seção 2.2.4 foram adicionados a 50 mL de ácido oxálico 0,5% (g/g) e centrifugados a 3500 rpm por 15 min, a 25 °C. Então, 10 mL do sobrenadante foram titulados em triplicata com uma solução 0,1% (g/g) de DCFI, sendo o ponto de viragem detectado pela mudança na coloração da solução para rosa, devido à redução completa do DCFI pelo ácido ascórbico. Os resultados foram expressos como mg ácido ascórbico 100 g⁻¹ de morangos.

2.4.4 Atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH

O sobrenadante obtido no item 2.4.1 também foi utilizado para a determinação da atividade antioxidante dos morangos frente ao radical livre DPPH (ESHGHI *et al.*, 2014). Para tanto, 10 µL do sobrenadante foram colocados para reagir com 190 µL do radical livre DPPH (na concentração de 0,03 g L⁻¹ em metanol), em triplicata, e a absorbância foi lida em 517 nm após 30 min de reação. A % de inibição das amostras contra o radical foi determinada segundo a Equação (2.1) do capítulo 2.

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{Abs branco} - \text{Abs final}}{\text{Abs branco}} \times 100 \quad \text{Equação (2.1)}$$

2.5 Perfil de compostos voláteis

O estudo do perfil de compostos voláteis dos morangos teve início com uma etapa preliminar de escolha do material de recobrimento das fibras de SPME (do inglês *solid phase microextraction*). Para isso, os diferentes materiais de recobrimento das fibras de SPME foram testados com as amostras no modo *headspace* (do inglês HS-SPME, *headspace solid-phase microextraction*). Para tanto, frutos de morango genéricos (ou seja, que não faziam parte do experimento de revestimento e pós-colheita, mas também da variedade Camino Real) foram triturados com solução saturada de NaCl na proporção de 1:1 para a obtenção de um purê de polpa. Então, 3 g desse purê foram transferidos para *vials* próprios para SPME (40 mL, dotados de tampa de rosca e septo PTFE/silicone) e colocados dentro de um béquer encamisado acoplado a um banho termostático (SIOLAB, modelo SL 152) para controle fino da temperatura de extração. Após 10 min de equilíbrio, uma fibra de SPME foi exposta ao *headspace* das amostras para captura e concentração dos voláteis. Foram testadas cinco fibras comerciais de SPME: PA (poliacrilato, 85 μm), PDMS (polidimetilsiloxano, 100 μm), CAR-PDMS (Carboxen®/ polidimetilsiloxano, 75 μm), DVB-PDMS (divinilbenzeno/ polidimetilsiloxano, 65 μm) e DVB-CAR-PDMS (divinilbenzeno/ Carboxen®/ polidimetilsiloxano, 50/30 μm) (Supelco). Para a extração, foram escolhidas arbitrariamente as condições de 30 °C para a temperatura de extração, 10 min para o tempo de equilíbrio e 30 min para o tempo de extração. Todas as extrações foram feitas em triplicata para cada uma das fibras testadas.

Depois da extração, as fibras eram imediatamente introduzidas no injetor do cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa quadrupolar (GC-MS 2010Plus, Shimadzu) para que ocorresse a dessorção dos analitos em modo *splitless*, a 220 °C por 10 min. Depois da dessorção, cada fibra era recondicionada a 250 °C por 15 min para garantir a ausência de picos nos brancos de fibra (BOGUSZ *et al.*, 2011).

A separação dos analitos ocorreu em uma coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). As condições cromatográficas utilizadas foram: injetor a 220 °C no modo *splitless* (1 min), gás de arraste hélio a 1,0 mL min⁻¹, rampa de temperatura do forno iniciando a 40 °C, com um incremento de 2 °C min⁻¹ até

90 °C, seguido de um incremento de 3 °C min⁻¹ até 170 °C, interface a 250 °C e fonte de ionização por elétrons em +70 eV (35–350 m/z).

A identificação dos compostos voláteis se deu por meio de comparações entre os espectros de massa obtidos nas amostras com os espectros de massa da literatura (biblioteca Willey 229), com um mínimo de similaridade de 85%. Uma solução de alcanos (C6-C20) (Atech) foi injetada sob as mesmas condições cromatográficas das amostras para a obtenção dos índices de retenção lineares de temperatura programada de Van den Dool e Kratz (LTPRI, do inglês *linear temperature programmed retention indexes*). Foi considerada a variação máxima de ± 10 nos índices de retenção no momento de identificar os analitos.

A escolha da fibra de SPME capaz de extrair uma maior quantidade de compostos voláteis do morango foi determinada considerando-se a área total cromatograma e o número de compostos identificados.

Uma vez concluída a etapa de escolha da fibra, deu-se início à extração dos compostos voláteis dos morangos revestidos e não revestidos. Para tanto, seguiu-se os mesmos procedimentos de extração, injeção e separação descritos nos parágrafos anteriores, para os morangos dos grupos controle, QG e QGE dos dias 0, 6 e 12 de análise. Todas as extrações foram feitas em triplicata para cada grupo de morangos, em cada um dos dias de análise.

2.6 Teste do desafio

Para avaliação da influência dos revestimentos sobre a qualidade microbiológica dos morangos, seguiu-se o método de controle da contaminação fúngica proposto por Kowalczyk *et al.* (2017), com algumas modificações. Após a imersão dos frutos (n = 10) nas soluções de revestimento, eles foram secos sob condições assépticas durante 2 h a 25 °C em uma capela de fluxo laminar. Em seguida, os frutos foram feridos (3 mm profundidade x 2 mm largura) com uma agulha estéril em lados opostos, onde foram aplicados 10 µL da suspensão de esporos (10⁵ esporos mL⁻¹) dos fungos *R. stolonifer* e *B. cinerea*, separadamente. Os frutos controles e os revestidos foram separados em bandejas plásticas e armazenados a 25 °C para que o desenvolvimento das lesões se desse no tempo hábil das análises (ou seja, 12 dias). Foram atribuídos valores de 1 a 5 para a severidade das lesões nos morangos, sendo a escala utilizada: 1 – de 1 a 20% da

área total do fruto contaminada; 2 – de 21 a 40%; 3 – de 41 a 60%; 4 – de 61 a 80%; 5 – de 81 a 100%.

2.7 Análise sensorial

Os morangos revestidos e não revestidos foram também submetidos a um teste sensorial de comparação múltipla (também chamado de teste de diferença do controle), segundo a NBR 13526 (ABNT, 1995). Neste teste, foram avaliados a diferença e o grau de diferença entre os morangos revestidos com QG e QGE e uma amostra controle, no caso, morangos não revestidos. O teste foi conduzido com 19 avaliadores treinados na percepção de atributos de cor, aroma, gostos básicos e textura. Os provadores foram treinados no teste sensorial de comparação múltipla e na percepção dos atributos sensoriais avaliados na disciplina 7500061 - Análise Sensorial, oferecida no primeiro semestre de 2022 no IQSC/USP pelo Prof. Dr. Stanislau Bogusz Junior. Para a condução do teste sensorial, obteve-se aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro Universitário Central Paulista – UNICEP, dentro do projeto “*Efeito de revestimentos comestíveis com óleos essenciais nas propriedades sensoriais de frutas e hortaliças*”, sob responsabilidade do pesquisador Dr. Marcos David Ferreira da Embrapa Instrumentação (CAAE: 28847220.0.0000.5380) (Anexo III desta tese). Os provadores que participaram do teste sensorial também receberam e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Figura A5 nos apêndices desta tese).

Para as análises, os provadores receberam as amostras de morango devidamente codificadas de forma randômica e casualizada, junto com uma folha de instruções (Figura A6 nos apêndices desta tese). Foi solicitado que os provadores avaliassem primeiro a amostra controle (P, morango não revestido) e em seguida as três amostras testes, e que atribuíssem a cada uma das amostras testes uma nota de 1 a 9, sendo 1 = extremamente melhor que P e 9 = extremamente pior que P, indicando o quanto cada amostra se diferenciava, em termos globais, da amostra P. O tratamento dos dados foi feito por ANOVA para avaliação da existência ou ausência de diferenças significativas entre as amostras em comparação com a amostra controle.

2.8 Estimativa do custo dos revestimentos

O custo dos revestimentos preparados e aplicados aos morangos foi estimado de acordo com quatro etapas principais: 1) obtenção do extrato de casca de romã, 2) obtenção da quitosana, 3) preparo dos revestimentos e 4) aplicação dos revestimentos nos morangos. Considerou-se o consumo de energia dos equipamentos utilizados nessas quatro etapas, bem como o gasto de consumíveis como gases e água. Além disso, considerou-se o preço dos reagentes utilizados em cada uma das etapas. Todos os cálculos foram feitos com base no revestimento de 100 morangos, o que é viável de ser reproduzido em escala laboratorial, conforme feito durante o desenvolvimento desta tese.

2.9 Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi adotado para a análise de parametricidade, e o programa ActionStat (Estatcamp, 2014, São Carlos, SP, Brasil) foi utilizado para avaliar a homogeneidade dos dados; dados paramétricos e homogêneos foram analisados quanto à sua significância por ANOVA, seguida pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$), e dados não paramétricos foram analisados quanto à sua significância pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

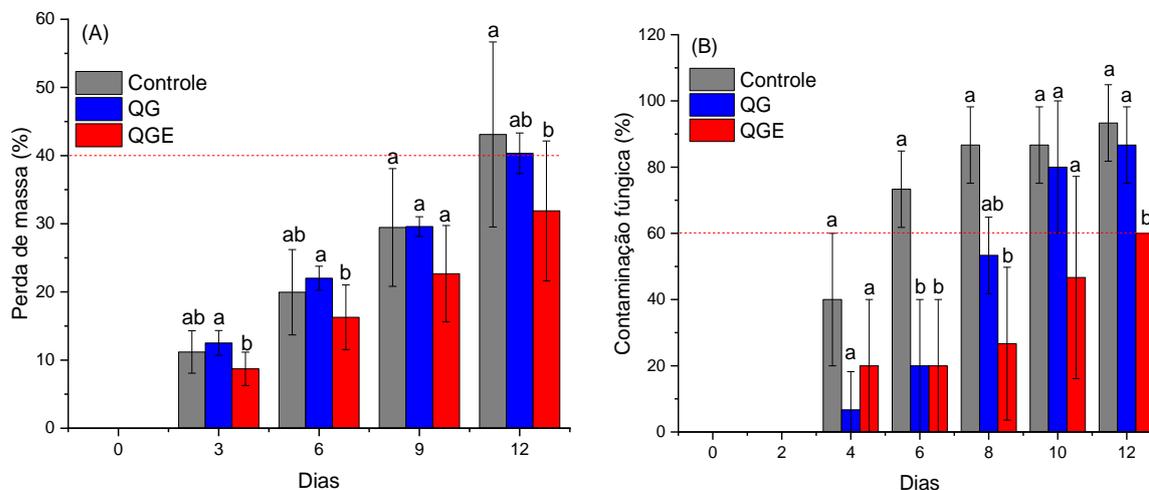
3.1 Parâmetros físico-químicos dos morangos

3.1.1 Perda de massa e contaminação fúngica

A Figura 4.1 mostra os gráficos de perda de massa e de contaminação fúngica dos morangos revestidos e não revestidos, ao longo dos 12 dias de armazenamento refrigerado. Em praticamente todos os dias de análise, os morangos revestidos com QGE apresentaram porcentagens de perda de massa significativamente menores ($p \leq 0,05$) que os morangos do grupo controle (Figura 4.1(A)). Até o sexto dia de armazenamento, os morangos revestidos com QGE eram os únicos com uma porcentagem média de perda de massa inferior a 20%. Ao final dos 12 dias, a perda de massa média do grupo controle foi de $43,09 \pm 13,58\%$, enquanto as perdas dos grupos QG e QGE foram de $40,33 \pm 2,98$ e $31,89 \pm 10,25\%$, respectivamente. A diferença observada entre os grupos revestidos pode ser explicada pela formação de uma rede polimérica mais intrincada na presença do extrato de casca de romã, conforme previsto pelos ensaios reológicos (apresentados no capítulo anterior), a qual atua como uma barreira semipermeável à passagem de água, desacelerando a perda de umidade e reduzindo a transpiração dos frutos (GUERREIRO *et al.*, 2015).

Em relação à contaminação fúngica (Figura 4.1(B)), os morangos não revestidos apresentaram uma porcentagem de contaminação muito mais elevada que os morangos revestidos com ambos os tratamentos. Até o sexto dia de análise, apenas 20% dos morangos revestidos por QG e QGE apresentavam sinais visíveis de crescimento fúngico, enquanto mais de 70% dos morangos do grupo controle já haviam sido contaminados. Ao final da análise, 60% dos morangos do grupo QGE apresentavam-se fungados, cerca de 20% a menos que os morangos do grupo QG e 30% a menos que os morangos do grupo controle. O limiar de 60% de contaminação, atingido apenas no décimo segundo dia para os morangos do grupo QGE, foi ultrapassado pelos morangos do grupo controle entre os dias 4 e 6, representando um ganho de cerca de 6-8 dias no tempo de armazenamento dos frutos. Tal resultado também pode ser atribuído à presença do extrato de casca de romã e à atividade antimicrobiana associada a extratos vegetais devido à presença de compostos fenólicos (MARTINS-RAMOS; BORTOLUZZI; MANTOVANI, 2010), conforme havia sido previsto pelos ensaios antimicrobianos do capítulo anterior.

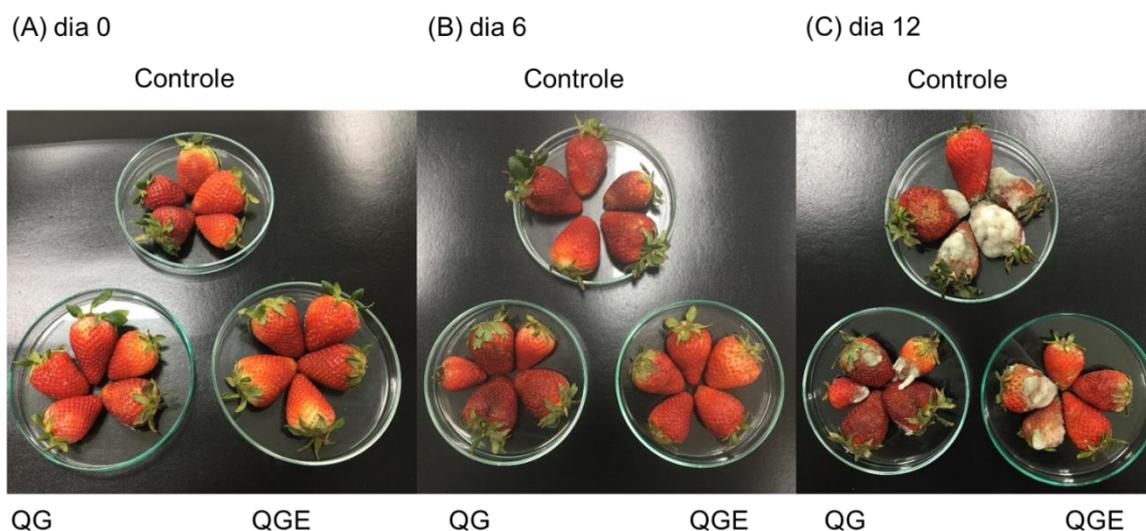
Figura 4.1. (A) perda de massa e (B) contaminação fúngica dos morangos revestidos e não revestidos, ao longo dos 12 dias de armazenamento refrigerado.



Fonte: autoria própria. Diferentes letras sobrescritas indicam amostras estatisticamente diferentes por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$), para cada dia de análise.

A Figura 4.2 mostra morangos dos três grupos nos dias 0, 6 e 12 de armazenamento refrigerado. De forma geral, os morangos revestidos com os tratamentos QG e QGE apresentaram uma menor incidência de contaminação fúngica, o que corrobora com os resultados mostrados na Figura 4.1(B). Visualmente, os morangos do grupo QGE apresentam um melhor controle da coloração ao longo do armazenamento, enquanto os demais frutos (não revestidos e revestidos com QG) apresentaram-se mais escuros ao final dele.

Figura 4.2. Fotografia digital dos morangos revestidos e não revestidos, nos dias (A) 0, (B) 6 e (C) 12 de armazenamento refrigerado.



Fonte: autoria própria.

3.1.2 Cor

A cor é um dos atributos físico-químicos de maior importância usados pelos consumidores no momento da compra de frutas e vegetais (SCHIFFERSTEIN; WEHRLE; CARBON, 2019), sendo, portanto, essencial sua avaliação ao longo do período pós-colheita para os morangos revestidos e não revestidos. A Tabela 4.1 mostra os valores dos parâmetros de cor (L^* , C^* , h° e ΔE) obtidos para os morangos ao longo dos dias de armazenamento.

Tabela 4.1. Parâmetros de cor (L^* , C^* , h° e ΔE) para os morangos controle (não revestidos), QG e QGE ao longo dos 12 dias de armazenamento refrigerado.

Controle	Dias	L^*	C^*	Ângulo Hue ($^\circ$)	ΔE
	0	31,26 ± 1,82 ^{Aa}	32,67 ± 3,51 ^{Aa}	28,15 ± 4,73 ^{Aa}	-
	3	28,41 ± 1,77 ^{Ab}	34,02 ± 3,72 ^{Aa}	29,20 ± 4,12 ^{Aa}	5,38 ± 1,75 ^{Ab}
	6	26,98 ± 1,44 ^{Bb}	31,42 ± 4,52 ^{Ab}	26,94 ± 3,19 ^{Aa}	6,34 ± 2,07 ^{Ab}
	9	24,29 ± 2,98 ^{Ac}	27,74 ± 5,26 ^{Ab}	28,73 ± 4,27 ^{Aa}	9,61 ± 4,32 ^{Aa}
	12	27,84 ± 2,69 ^{Ab}	27,85 ± 5,66 ^{Ab}	30,44 ± 5,56 ^{Aa}	7,86 ± 4,30 ^{Bab}
QG	Dias	L^*	C^*	Ângulo Hue ($^\circ$)	ΔE
	0	29,19 ± 3,00 ^{Aa}	32,49 ± 5,01 ^{Aa}	26,74 ± 3,85 ^{Aa}	-
	3	27,26 ± 2,43 ^{Aab}	30,19 ± 5,59 ^{Aab}	25,28 ± 5,79 ^{ABa}	6,44 ± 3,50 ^{Ab}
	6	27,27 ± 2,51 ^{Bab}	27,65 ± 5,05 ^{ABabc}	25,20 ± 4,32 ^{Aa}	7,03 ± 3,57 ^{Aab}
	9	24,73 ± 2,53 ^{Ab}	26,34 ± 4,65 ^{Abc}	27,13 ± 5,61 ^{Aa}	8,51 ± 4,30 ^{Aab}
	12	25,64 ± 2,41 ^{Ab}	22,79 ± 3,77 ^{Bc}	27,21 ± 5,22 ^{ABa}	10,35 ± 4,12 ^{ABa}
QGE	Dias	L^*	C^*	Ângulo Hue ($^\circ$)	ΔE
	0	30,73 ± 3,34 ^{Aa}	34,06 ± 4,10 ^{Aa}	26,84 ± 4,60 ^{Aa}	-
	3	28,64 ± 2,79 ^{Aab}	30,39 ± 3,81 ^{Aab}	24,73 ± 3,81 ^{Aa}	5,83 ± 3,43 ^{Ab}
	6	29,41 ± 2,47 ^{Aab}	26,79 ± 3,31 ^{Bbc}	24,36 ± 3,31 ^{Aa}	8,32 ± 3,18 ^{Ab}
	9	25,11 ± 3,05 ^{Ac}	23,67 ± 3,48 ^{Ac}	24,71 ± 3,48 ^{Aa}	12,07 ± 4,37 ^{Aa}
	12	26,72 ± 2,07 ^{Abc}	23,12 ± 2,84 ^{Bc}	25,89 ± 2,84 ^{Ba}	11,82 ± 3,40 ^{Aa}

Fonte: autoria própria. Em uma mesma coluna, valores com letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas (por ANOVA e Tukey, $p \leq 0,05$) entre as amostras para um mesmo dia de armazenamento. Em uma mesma coluna, valores com letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas (por ANOVA e Tukey, $p \leq 0,05$) entre os dias de armazenamento para uma mesma amostra.

O parâmetro L^* indica a luminosidade de uma amostra e varia de 0 (preto) a 100 (branco). Para os morangos, L^* variou de 24,29 ± 2,98 a 31,26 ± 1,82. Para os três grupos foram observadas diminuições estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) desse parâmetro ao longo dos dias de armazenamento dos morangos, resultado que

está relacionado à perda de umidade da superfície dos frutos e à consequente diminuição da sua luminosidade (PERDONES *et al.*, 2012).

A cromaticidade (C^*) representa a saturação da cor, e varia de acordo com a posição dos parâmetros de vermelho, verde e azul no espaço de diagrama de cores. A desidratação dos frutos também explica as quedas observadas para os valores de cromaticidade (C^*) dos morangos a partir do terceiro dia de armazenamento. Para este parâmetro, entretanto, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) no último dia de armazenamento entre os frutos do grupo controle e os frutos revestidos (os quais apresentaram menores valores de C^* , apesar da menor desidratação observada nos resultados de perda de massa).

O ângulo Hue (h°) varia de 0 a 360° e é um indicativo da região da coloração dos frutos. Entre 0 e 90° , encontra-se a região do vermelho, entre 90° e 180° , a região do amarelo, entre 180 e 270° , a região do verde, e entre 270° e 360° , a região do azul. O parâmetro h° não apresentou variações estatisticamente significativas ao longo dos dias de análise, mas no último dia de armazenamento os morangos do grupo controle apresentaram um valor de h° significativamente maior ($p \leq 0,05$) que os morangos do grupo QGE. Valores de h° maiores para os morangos não revestidos podem ser atribuídos à sua contaminação fúngica mais acelerada, a qual acaba levando à degradação das antocianinas e à consequente diminuição da coloração vermelha. Essa diminuição desloca h° para regiões mais alaranjadas ou amareladas, mais próximas de 90° (HERNÁNDEZ-CARRILLO *et al.*, 2021). Resultados similares de aumento de h° foram observados por Oliveira Filho *et al.* (2022a), que recobriram seus morangos com nanoemulsões à base de cera de carnaúba e óleos essenciais. Os autores reportaram valores de h° próximos de 40° no final do armazenamento dos frutos.

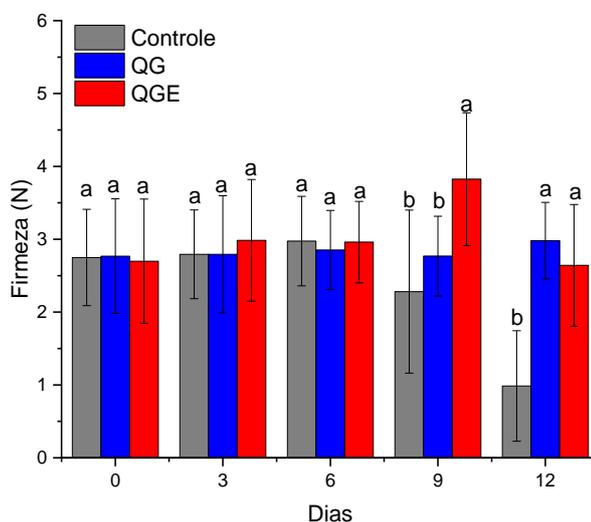
Os valores de variação total de cor (ΔE) foram calculados em relação aos parâmetros $L^*a^*b^*$ do dia 0 de armazenamento, para cada um dos grupos, e de forma geral cresceram de forma significativa ($p \leq 0,05$) ao longo do tempo para todos os frutos. Os frutos do grupo controle foram os únicos a apresentar uma queda na variação total de cor do nono para o décimo segundo dia de análise, o que pode estar relacionado à sua deterioração fúngica mais acelerada. No último dia de análise, os morangos revestidos apresentaram os maiores valores de ΔE , o que pode ter sido causado pela síntese de pigmentos como antocianinas ao longo do

armazenamento, a qual pode estar sendo retardada pela aplicação dos revestimentos (GOL; PATEL; RAO, 2013; OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2022a). De forma geral, a aplicação dos revestimentos foi positiva para os resultados dos parâmetros de cor, mostrando que a presença da quitosana, da gelatina e do extrato de casca de romã não afetou a aparência visual dos morangos e preservou a coloração dos frutos.

3.1.3 Firmeza

A firmeza é outro parâmetro físico-químico considerado um atributo de qualidade de frutos. Os principais motivos da perda de firmeza (ou amolecimento) dos morangos estão relacionados à degradação da parede celular, a qual ocorre principalmente devido à degradação dos tecidos vegetais como, por exemplo, a pectina, celulose e hemicelulose, promovida pela ação de microrganismos como os fungos, bem como devido à respiração e perda de água durante o período pós-colheita (PANIAGUA *et al.*, 2017). A Figura 4.3 mostra o gráfico de firmeza em função do tempo de armazenamento dos morangos revestidos e não revestidos.

Figura 4.3. Firmeza (em N) dos morangos revestidos e não revestidos ao longo dos 12 dias de armazenamento refrigerado.



Fonte: autoria própria. Diferentes letras sobrescritas indicam amostras estatisticamente diferentes por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$), para cada dia de análise.

Até o sexto dia de análise, os três grupos apresentavam valores de firmeza significativamente iguais e em torno de 3 N. A partir desse dia, a firmeza dos morangos do grupo controle passou a cair significativamente, chegando a valores menores que 1 N. A presença dos revestimentos QG e QGE nos demais morangos

foi capaz de manter a firmeza dos frutos mesmo após 12 dias de armazenamento, indicando que os revestimentos realmente atuaram como uma barreira contra a perda de água e a contaminação fúngica.

3.1.4 Teor de sólidos solúveis, acidez titulável e pH

A Tabela 4.2 mostra os resultados da análise de sólidos solúveis conduzida com os morangos revestidos e não revestidos ao longo dos 12 dias de armazenamento refrigerado. O teor de sacarose representado pelos valores de °Brix mede a quantidade de açúcares presentes nos morangos e tem influência direta sobre o sabor e a aceitabilidade dos frutos (MENZEL, 2022). Até o sexto dia de armazenamento, o teor de sólidos solúveis não sofreu variações significativas nos três grupos analisados e manteve-se estável. A partir desse dia, entretanto, esse parâmetro passou a cair de forma significativa ($p \leq 0,05$) para os morangos não revestidos, o que indica uma maior taxa de conversão dos açúcares, provavelmente associada a modificações na taxa de respiração dos frutos já bastante deteriorados (CHU *et al.*, 2020). Os revestimentos QG e QGE, por outro lado foram capazes controlar a taxa de conversão dos açúcares, mantendo o teor de sólidos solúveis relativamente estável ao longo do armazenamento dos frutos.

A acidez titulável está relacionada ao metabolismo dos frutos, uma vez que a respiração celular resulta no consumo dos ácidos orgânicos, diminuindo sua acidez total (CHU *et al.*, 2020). A acidez titulável dos morangos revestidos e não revestidos se manteve praticamente estável e sem variações significativas ao longo do armazenamento para os morangos revestidos por QGE (Tabela 4.2). No final do armazenamento, entretanto, os morangos do grupo controle e do grupo QG apresentaram um aumento significativo nos seus valores de acidez. Tal fato pode ser explicado pela maior contaminação fúngica nestes dois grupos (conforme observado na Figura 4.1(B)), a qual, possivelmente, deu início a produção de metabólitos ácidos, elevando os valores de acidez total (CHU *et al.*, 2020).

Tabela 4.2. Teor de sólidos solúveis (°Brix), acidez titulável e pH dos morangos revestidos e não revestidos ao longo dos 12 dias de armazenamento refrigerado.

Controle	Dias	°Brix	Acidez titulável (g ácido cítrico/100 g)	pH
	0	6,23 ± 0,18 ^{Aa}	0,84 ± 0,07 ^{Aa}	3,30 ± 0,02 ^{Ac}
	3	5,90 ± 0,13 ^{Ba}	0,77 ± 0,02 ^{Aab}	3,36 ± 0,03 ^{Abc}
	6	6,20 ± 0,61 ^{Aa}	0,84 ± 0,08 ^{Aa}	3,36 ± 0,03 ^{Bc}
	9	5,00 ± 0,49 ^{Cb}	0,72 ± 0,07 ^{Ab}	3,43 ± 0,07 ^{Cab}
	12	4,50 ± 0,12 ^{Cb}	0,79 ± 0,05 ^{Bab}	3,49 ± 0,05 ^{Ca}
QG	Dias	°Brix	Acidez titulável (g ácido cítrico/100 g)	pH
	0	6,27 ± 0,63 ^{Ab}	0,70 ± 0,06 ^{Ab}	3,36 ± 0,13 ^{Ab}
	3	6,40 ± 0,19 ^{Ab}	0,72 ± 0,07 ^{Ab}	3,38 ± 0,03 ^{Ab}
	6	6,33 ± 0,07 ^{Ab}	0,72 ± 0,04 ^{Bb}	3,45 ± 0,05 ^{Ab}
	9	6,33 ± 0,40 ^{Bb}	0,80 ± 0,11 ^{Aab}	3,65 ± 0,03 ^{Ba}
	12	7,55 ± 0,22 ^{Aa}	0,88 ± 0,03 ^{Aa}	3,62 ± 0,02 ^{Ba}
QGE	Dias	°Brix	Acidez titulável (g ácido cítrico/100 g)	pH
	0	5,89 ± 0,15 ^{Ac}	0,76 ± 0,10 ^{Aa}	3,31 ± 0,11 ^{Ab}
	3	6,12 ± 0,42 ^{ABbc}	0,74 ± 0,09 ^{Aa}	3,38 ± 0,03 ^{Ab}
	6	6,33 ± 0,12 ^{Ab}	0,79 ± 0,05 ^{ABa}	3,42 ± 0,04 ^{Ab}
	9	7,61 ± 0,09 ^{Aa}	0,79 ± 0,06 ^{Aa}	3,75 ± 0,04 ^{Aa}
	12	5,85 ± 0,07 ^{Bc}	0,71 ± 0,02 ^{Ca}	3,74 ± 0,07 ^{Aa}

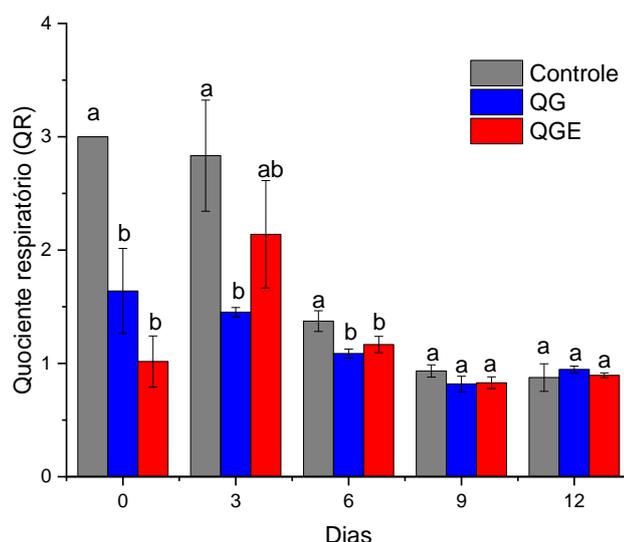
Fonte: autoria própria. Em uma mesma coluna, valores com letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas (por ANOVA e Tukey, $p \leq 0,05$) entre as amostras para um mesmo dia de armazenamento. Em uma mesma coluna, valores com letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas (por ANOVA e Tukey, $p \leq 0,05$) entre os dias de armazenamento para uma mesma amostra.

Os valores de pH dos frutos ao longo do armazenamento são mostrados na Tabela 4.2. Em todos os grupos o pH aumentou significativamente ($p \leq 0,05$) com o passar do tempo, o que pode estar relacionado ao consumo dos ácidos orgânicos e à diminuição na acidez total, conforme explicado no parágrafo anterior. Além disso, a partir do sexto dia de análise os morangos dos grupos QG e controle passaram a apresentar valores de pH significativamente menores ($p \leq 0,05$) que os morangos do grupo QGE. Tal resultado concorda com os resultados de acidez titulável e provavelmente está relacionado à acidificação do meio devido aos metabólitos ácidos produzidos pelos fungos (TOMADONI *et al.*, 2019). Oliveira Filho *et al.* (2022a) reportaram a mesma tendência de menores valores de pH ($< 3,0$) para seus morangos não revestidos, ao final do armazenamento.

3.2 Respiração

A Figura 4.4 mostra o gráfico de barras do quociente respiratório (QR) dos morangos, definido como a razão entre o número de mols de CO₂ produzidos na respiração pelo número de mols de O₂ consumidos neste processo. De forma geral, o QR de frutas e vegetais varia de 0,7 a 1,3 em condições de respiração aeróbia (PAREEK, 2018) e seu valor está relacionado ao tipo de substrato que está sendo utilizado pelo processo respiratório. Valores de QR < 1 indicam que lipídeos estão sendo usados como substrato para a respiração. Se QR = 1, os carboidratos da fruta/vegetal são os substratos disponíveis e se QR >1, ácidos orgânicos estão sendo usados (FONSECA *et al.*, 2002).

Figura 4.4. Quociente respiratório (QR) dos morangos revestidos e não revestidos ao longo dos dias de armazenamento.



Fonte: autoria própria. Diferentes letras sobrescritas indicam amostras estatisticamente diferentes por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$), para cada dia de análise.

Todos os grupos de morangos apresentaram uma tendência de diminuição do QR ao longo do armazenamento, o que está relacionado à diminuição das taxas de respiração durante o processo de senescência dos frutos. Os morangos do grupo controle foram os frutos que apresentaram uma queda mais pronunciada no QR ao longo do tempo, principalmente até o sexto dia de armazenamento. A presença dos revestimentos nos grupos QG e QGE levou a mudanças menos bruscas nos valores de QR, uma vez que os materiais atuam como uma barreira à passagem de gases, modificando a atmosfera ao redor do fruto e reduzindo sua taxa respiratória (GARCIA *et al.*, 2012; OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2022a). Até o sexto dia de análise, os

revestimentos tiveram uma influência significativa ($p \leq 0,05$) sobre os valores de QR dos morangos, o que comprova sua capacidade em desacelerar as taxas respiratórias dos frutos.

A partir do nono dia de análise, os frutos de todos os grupos passaram a apresentar valores de QR menores que 1, indicando o fim do uso de ácidos orgânicos como substratos principais para o processo respiratório. Tal resultado concorda com o que foi observado para os valores de pH dos frutos e provavelmente também está relacionado à maior contaminação fúngica observada para os frutos no final de seu armazenamento. Reduções nas taxas respiratórias de frutos devido à presença de revestimentos poliméricos já foram reportadas para tomates, peras, *blackberries*, morangos, dentre outros (CARVALHO *et al.*, 2015; JOSHI *et al.*, 2021; OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2022a).

3.3 Compostos bioativos e atividade antioxidante

A Tabela 4.3 mostra o conteúdo total de fenólicos, em mg EAG 100 g⁻¹ morango, para os frutos revestidos e não revestidos ao longo do armazenamento. O teor de fenólicos dos morangos variou de $66,72 \pm 1,74$ a $132,02 \pm 6,21$ mg EAG 100 g⁻¹. No grupo controle, foi observado um aumento significativo ($p \leq 0,05$) no conteúdo de fenólicos até o sexto dia de análise, seguido por uma queda também significativa até o final do armazenamento. As tendências observadas nos grupos revestidos, entretanto, foram diferentes. Os morangos revestidos por QG apresentaram uma diminuição significativa ($p \leq 0,05$) no conteúdo de fenólicos até o nono dia de análise e um aumento significativo ($p \leq 0,05$) no final do armazenamento. Os morangos revestidos por QGE, por sua vez, apresentaram o maior conteúdo total de fenólicos ao final de seu armazenamento.

Tabela 4.3. Compostos bioativos (conteúdo total de fenólicos, antocianinas e vitamina C) e atividade antioxidante (% de inibição) contra o radical DPPH dos morangos revestidos e não revestidos ao longo dos 12 dias de armazenamento refrigerado.

Controle	Dias	mg EAG 100 g ⁻¹	mg cianidina-3-glicosídeo 100 g ⁻¹	mg ácido ascórbico 100 g ⁻¹	% inibição
	0	104,37 ± 5,69 ^{Ab}	27,70 ± 0,40 ^{Ab}	18,37 ± 3,06 ^{Bc}	52,84 ± 4,27 ^{Aab}
	3	108,82 ± 3,39 ^{Ab}	28,21 ± 0,53 ^{Ab}	25,51 ± 1,77 ^{ABb}	50,97 ± 6,03 ^{Aab}
	6	132,02 ± 6,21 ^{Aa}	33,39 ± 0,27 ^{Aa}	32,65 ± 1,77 ^{Aa}	63,17 ± 4,99 ^{Aa}
	9	101,39 ± 1,37 ^{Ab}	19,43 ± 0,21 ^{Ad}	32,65 ± 1,77 ^{Aa}	38,86 ± 2,23 ^{Ab}
	12	106,86 ± 6,56 ^{Ab}	23,10 ± 0,29 ^{Ac}	9,18 ± 0,01 ^{Bd}	50,41 ± 4,50 ^{Aab}
QG	Dias	mg EAG 100 g ⁻¹	mg cianidina-3-glicosídeo 100 g ⁻¹	mg ácido ascórbico 100 g ⁻¹	% inibição
	0	106,68 ± 2,68 ^{Aa}	21,65 ± 1,36 ^{Ba}	28,57 ± 1,77 ^{Aa}	59,72 ± 7,22 ^{Aa}
	3	110,09 ± 7,82 ^{Aa}	19,56 ± 1,18 ^{Cab}	30,61 ± 3,06 ^{Aa}	44,08 ± 1,72 ^{Aa}
	6	85,32 ± 4,84 ^{Bb}	15,18 ± 0,97 ^{Cc}	30,61 ± 5,30 ^{Aa}	62,07 ± 9,28 ^{Aa}
	9	66,72 ± 1,74 ^{Bc}	17,03 ± 0,61 ^{Bbc}	25,51 ± 1,77 ^{Ba}	38,37 ± 2,92 ^{Aa}
	12	90,72 ± 4,02 ^{Bb}	21,00 ± 1,17 ^{Aa}	25,51 ± 1,77 ^{Aa}	51,62 ± 4,22 ^{Aa}
QGE	Dias	mg EAG 100 g ⁻¹	mg cianidina-3-glicosídeo 100 g ⁻¹	mg ácido ascórbico 100 g ⁻¹	% inibição
	0	90,98 ± 2,31 ^{Bbc}	17,74 ± 0,04 ^{Cd}	14,29 ± 1,77 ^{Bc}	59,56 ± 3,49 ^{Aab}
	3	100,65 ± 4,30 ^{Aa}	23,65 ± 0,32 ^{Bb}	23,47 ± 1,77 ^{Bb}	60,05 ± 2,07 ^{Aab}
	6	81,91 ± 7,88 ^{Bc}	26,76 ± 0,37 ^{Ba}	27,55 ± 3,06 ^{Aab}	50,81 ± 3,78 ^{Ab}
	9	71,46 ± 10,35 ^{Bc}	19,42 ± 0,48 ^{Ac}	29,59 ± 1,77 ^{ABa}	39,38 ± 3,44 ^{Ad}
	12	107,98 ± 3,59 ^{Aa}	22,55 ± 1,19 ^{Ab}	23,47 ± 2,77 ^{Ab}	61,91 ± 5,89 ^{Aa}

Fonte: autoria própria. Em uma mesma coluna, valores com letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas (por ANOVA e Tukey, $p \leq 0,05$) entre as amostras para um mesmo dia de armazenamento. Em uma mesma coluna, valores com letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas (por ANOVA e Tukey, $p \leq 0,05$) entre os dias de armazenamento para uma mesma amostra.

Diferenças no conteúdo de fenólicos dos frutos podem ser atribuídas à disponibilidade de oxigênio para a ação da enzima polifenol oxidase, a qual leva à oxidação dos fenólicos durante a senescência dos frutos (GOL; PATEL; RAO, 2013; MOUSAVI; RAHMATI-JONEIDABAD; NOSHAD, 2021). Os revestimentos formam uma barreira à passagem de gases e reduzem as taxas respiratórias, conforme visto no item anterior, o que tende a estabilizar o conteúdo de fenólicos ao longo do armazenamento (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2022a). Isso explica o fato de os maiores conteúdos de fenólicos dos morangos revestidos terem sido observados no fim de seu armazenamento, o que não ocorreu no grupo controle. Além disso, o fato de os valores observados para os frutos revestidos por QGE serem maiores em

comparação a QG também pode estar relacionado à presença do extrato de casca de romã, o qual é quantificado junto com os fenólicos dos morangos revestidos por QGE (QUINTANA *et al.*, 2021). De forma geral, o grupo QGE foi o único que apresentou um aumento significativo ($p \leq 0,05$) no conteúdo de fenólicos do início ao final do armazenamento, o que indica que a sua aplicação foi eficaz em aumentar e preservar o conteúdo total de fenólicos dos morangos.

O teor de antocianinas dos morangos, apresentado na Tabela 4.3, variou de $15,18 \pm 0,97$ a $33,39 \pm 0,27$ mg cianidina-3-glicosídeo 100 g^{-1} . De forma geral, o tempo de armazenamento teve o mesmo efeito observado para o conteúdo total de fenólicos para os morangos do grupo controle, ou seja, de aumento até o sexto dia de armazenamento, seguido por uma queda significativa nos últimos dias de análise. Esse aumento no teor de antocianinas no início do armazenamento pode estar associado à síntese desses pigmentos durante a senescência dos frutos, que se tornam mais vermelhos e mais escuros ao longo do tempo (GOL; PATEL; RAO, 2013).

Os revestimentos atuam modificando a atmosfera interna dos frutos e retardando as reações bioquímicas que levam à síntese das antocianinas (GOL; PATEL; RAO, 2013; LIU *et al.*, 2018). Por essa razão, a tendência para os valores de antocianinas dos morangos dos grupos QG e QGE foi diferente da observada para os morangos do grupo controle. Os morangos revestidos por QGE foram os únicos a apresentarem teores maiores de antocianinas no último dia de armazenamento quando comparado ao início, o que concorda com os resultados de ângulo Hue (relacionado à coloração vermelha dos frutos) apresentados no item 3.1.2. Mais uma vez, pode-se dizer que a presença de QGE foi positiva em manter o conteúdo de compostos bioativos dos morangos no final de seu período de armazenamento.

O teor de vitamina C dos morangos, expresso em mg ácido ascórbico 100 g^{-1} de frutos, foi um dos parâmetros que sofreu variações mais pronunciadas em função do tempo de armazenamento e da presença dos revestimentos (Tabela 4.3). Os morangos do grupo controle mantiveram a tendência observada para o conteúdo total de fenólicos e o teor de antocianinas, ou seja, de aumento do teor de vitamina C no começo do armazenamento seguido por uma diminuição significativa ($p \leq 0,05$) no final dele. No décimo segundo dia de análise, os morangos deste grupo foram os

que apresentaram os menores valores de vitamina C. A diminuição nos teores de vitamina C dos frutos ao longo de seu armazenamento pode estar associada à oxidação irreversível do ácido ascórbico para o ácido dehidroascórbico na presença de oxigênio (ROJAS; GERSCHENSON, 2001).

A variação nos teores de vitamina C dos morangos revestidos foi mais controlada ao longo do tempo devido à presença dos revestimentos. Da mesma forma observada para os resultados anteriores, os morangos do grupo QGE foram os únicos a apresentarem um teor de vitamina C maior no final do armazenamento, quando comparado ao início. Resultados similares de atraso na diminuição do conteúdo de ácido ascórbico de morangos revestidos foram reportados por Gol, Patel e Rao (2013), Mousavi, Rahmati-Joneidabad e Noshad (2021) e Oliveira Filho *et al.* (2022a).

De forma geral, os resultados dos teores de compostos bioativos dos morangos revestidos por QGE foram encorajadores. Os compostos fenólicos e a vitamina C trazem diversos benefícios à saúde de quem consome os frutos, enquanto as antocianinas são as principais responsáveis pela coloração dos morangos, o que afeta diretamente em sua aceitação por parte do consumidor (PARRA-PALMA; MORALES-QUINTANA; RAMOS, 2020; THOMAS *et al.*, 2016).

A Tabela 4.3 mostra os resultados de % inibição dos morangos revestidos e não revestidos frente ao radical DPPH, ao longo dos 12 dias de armazenamento refrigerado. Na concentração utilizada para as amostras (ou seja, sobrenadante proveniente da extração de 2 g de polpa em 40 mL de metanol, colocado para reagir na proporção de 1:19 frente ao radical DPPH), as % de inibição variaram de $38,37 \pm 2,92$ para $63,17 \pm 4,99\%$.

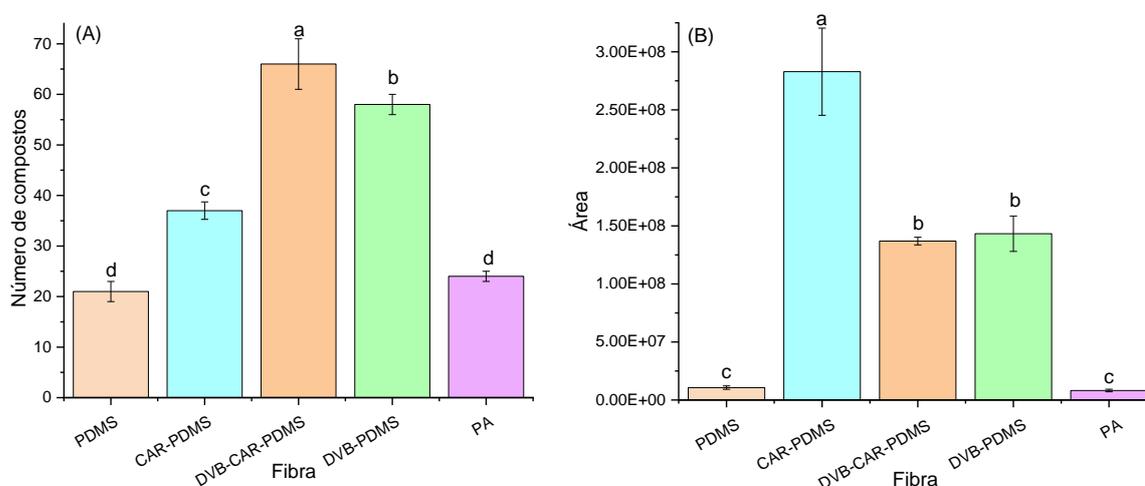
De forma geral, as variações observadas para as % de inibição, tanto em função do tempo quanto em função da presença do revestimento, seguiram as mesmas tendências observadas para as variações nos conteúdos de compostos fenólicos, antocianinas e vitamina C, os compostos bioativos responsáveis, em grande parte, pela atividade antioxidante de morangos e outros alimentos (MOUSAVI; RAHMATI-JONEIDABAD; NOSHAD, 2021). No último dia de armazenamento, os morangos revestidos por QGE foram os que apresentaram a maior inibição frente ao radical DPPH, o que já era esperado devido aos resultados positivos dos teores de compostos bioativos dos morangos deste grupo.

3.4 Perfil de compostos voláteis

A Figura 4.5 mostra os resultados de número total de picos (Figura 4.5(A)) e área total do cromatograma (Figura 4.5(B)) para cada uma das cinco fibras de SPME testadas para a extração dos compostos voláteis dos morangos. Cada fibra foi exposta ao *headspace* das amostras nas mesmas condições de tempo e temperatura de equilíbrio e de extração, o que faz com que as diferenças observadas para o número de compostos extraídos e para a área total destes compostos nos cromatogramas seja atribuída à polaridade e à afinidade dos diferentes materiais de revestimento das fibras (Figura A7 nos apêndices desta tese) pelos compostos extraídos (BOGUSZ *et al.*, 2011).

A fibra CAR-PDMS foi a que apresentou uma maior área total de compostos extraídos (Figura 4.5(B)), seguida pelas fibras DVB-PDMS e DVB-CAR-PDMS. Apesar de não ter apresentado a maior área total, a fibra tripla DVB-CAR-PDMS foi a que extraiu o maior número total de compostos voláteis (66 ± 5) (Figura 4.5(A)). Os compostos que foram identificados para cada uma das cinco fibras, bem como seus índices de retenção calculados, encontram-se na Tabela 4.4, separados por classe química. De forma geral, os ésteres foram os compostos encontrados em maior quantidade nos morangos (36), seguidos por aldeídos e cetonas (15), terpenos (12), álcoois (6), furanos e lactonas (2).

Figura 4.5. (A) Número total de picos e (B) área total dos cromatogramas obtidos pela extração dos voláteis dos morangos com uso das cinco diferentes fibras de SPME testadas.



Fonte: autoria própria. Diferentes letras sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$).

Dos 66 compostos totais apresentados pelos morangos extraídos com a fibra DVB-CAR-PDMS, 59 foram identificados por GC-MS. A união de três tipos de materiais de revestimento em uma única fibra, isto é, o divinilbenzeno, o Carboxen® e o polidimetilsiloxano, provavelmente aumentou a capacidade de extração de um maior número de voláteis de diferentes polaridades e classes químicas. Este fenômeno ocorre pela maior afinidade dos compostos que estão sendo extraídos dos morangos, fazendo com que a fibra DVB-CAR-PDMS atue com uma polaridade intermediária em relação às demais fibras (sendo a ordem de polaridade: PDMS < CAR-PDMS < DVB-CAR-PDMS < DVB-PDMS < PA) (MARQUES, 2021; PINHEIRO *et al.*, 2019). Assim, a fibra tripla DVB-CAR-PDMS foi a escolhida para a sequência das análises de extração de compostos voláteis dos morangos revestidos e não revestidos ao longo do armazenamento. Um cromatograma exemplificando os compostos extraídos para os morangos por essa fibra é apresentado na Figura A8 nos apêndices desta tese.

Tabela 4.4. Compostos voláteis identificados nos morangos, seus LTPRI calculados e da literatura, a diferença entre eles (Δ), e as fibras empregadas para sua extração.

Compostos	LTPRI calculado	LTPRI literatura	Δ	DVB-CAR-PDMS	CAR-PDMS	PDMS	PA	DVB-PDMS
Ésteres								
1-Metil acetato	657	662	5	X	X	X	X	X
1-Metil butanoato	839	837	-2	X	X	X	X	X
1-Metilpropil etanoato	755	745	-10	X				
2-Etilhexil acetato	1154	1159	5	X				X
2-Metilbutil acetato	878	880	2	X		X	X	X
2-Metilbutil butanoato	875	876	1	X	X	X		X
Benzil acetato	1165	1165	0	X		X	X	X
Butil acetato	813	812	-1	X	X	X	X	X
Butil butanoato	998	994	-4	X	X			
cis-3-hexenil-1-acetato	1009	1008	-1	X	X			
Etil 2-metilbutanoato	846	842	-4	X	X	X		X
Etil 3-metilbutanoato	849	859	10	X	X	X		X
Etil butanoato	802	802	0	X	X	X	X	X
Etil etanoato	609	612	3	X	X	X	X	X
Etil hexanoato	1002	996	-6	X	X	X	X	X
Etil isobutanoato	755	755	0	X				X
Etil octanoato	1199	1196	-3	X		X		X
Hexil etanoato	979	987	8	X	X	X		X
Hexil formato	867	870	3	X	X			
Isoamil acetato	875	878	3			X	X	

Capítulo 4 – Resultados e Discussões

Isobutil butanoato	937	939	2	X					X
Isobutil etanoato	771	764	-7			X			
Isopropil 3-metilbutanoato	896	900	4	X					X
Isopropil caproato	1039	1034	-5	X	X		X		X
Metil 2-metilbutanoato	774	771	-3		X				
Metil butanoato	721	724	3	X	X		X	X	X
Metil hexanoato	925	924	-1	X	X		X	X	X
Metil isohexanoato	891	900	9	X					X
Metil isopentanoato	773	765	-8	X			X		X
Metil octanoato	1127	1128	1	X	X		X	X	X
Metil pentanoato	822	823	1						X
Metil propanoato	628	621	-7		X				X
<i>n</i> -octil acetato	1215	1215	0	X			X		X
Pentil acetato	915	916	1	X	X				X
Propil acetato	714	712	-2		X				X
<i>trans</i> -2-hexenil acetato	1018	1017	-1	X	X		X	X	X
Furanos e lactonas									
γ -Decalactona	1470	1463	-7	X			X	X	X
Mesifurano	1061	1065	4	X	X				X
Aldeídos e cetonas									
2,3-Octadiona	985	986	1	X					X
2-Metil-6-heptenona	987	987	0	X					X
2-Octenal	1056	1061	5	X					X

Capítulo 4 – Resultados e Discussões

3-Metilbutanona	647	654	7			X			
Benzaldeído	956	961	5						X
cis-2-heptenal	953	962	9	X		X			X
Heptanal	902	899	-3	X		X			X
n-Decanal	1206	1200	-6	X			X		X
n-Hexanal	801	802	1			X	X	X	
n-Nonanal	1104	1102	-2	X			X	X	X
n-Pentanal	701	702	1	X		X			X
trans-2-decenal	1263	1259	-4						X
trans-2-hexenal	848	850	2			X			
trans-2-pentenal	750	754	4	X					
trans-non-2-enal	1160	1161	1	X					X
Terpenos									
Linalool	1101	1104	3	X		X	X	X	X
α-Terpineol	1189	1187	-2	X					X
α-Muuroleno	1501	1497	-4	X			X		
α-Pineno	930	939	9	X					X
β-Mirceno	991	988	-3	X					X
β-Ocimeno	1048	1044	-4	X					
β-Pineno	972	979	7	X					X
Eucaliptol	1028	1031	3	X		X			X
Limoneno	1026	1027	1	X					X
Nerolidol	1566	1565	-1	X		X	X	X	X

Capítulo 4 – Resultados e Discussões

Paracimeno	1022	1025	3	X		X	X	X
Óxido de <i>trans</i>-Linalool	1087	1088	1	X				X
Álcoois								
2-Metil-butan-1-ol	734	736	2	X	X			X
Etilhexanol	1030	1029	-1	X				X
<i>n</i>-Hexanol	865	865	0	X	X			X
Octanol	1072	1070	-2	X				X
Pentanol	763	768	5	X	X			X
<i>trans</i>-2-Hexenol	864	874	10					X
Número total de compostos identificados				59	36	29	19	58

Fonte: autoria própria. Compostos marcados com “X” foram extraídos pela fibra analisada.

A Tabela 4.5 mostra o número de compostos voláteis extraídos e identificados, bem como sua área total média, para os morangos dos grupos controle, QG e QGE ao longo do armazenamento. No início do armazenamento, todos os grupos apresentaram cerca de 55-58 compostos voláteis. Esse número aumentou no sexto dia de análise para todos os grupos, tendência esperada devido à formação de novos compostos voláteis ao longo da maturação dos frutos, mas ao final do armazenamento os morangos do grupo controle foram os únicos a apresentar menos compostos voláteis em relação ao encontrado no início do armazenamento. Os valores de área total dos compostos também foram maiores para os morangos revestidos do que para os morangos controle. Enquanto os primeiros apresentaram reduções de 7,4% (QG) e 6,9% (QGE) em sua área total, do primeiro ao último dia de armazenamento, os frutos do grupo controle apresentaram 39,4% de redução na área total de seus compostos voláteis, uma perda cerca de 6 vezes maior.

Tabela 4.5. Número de compostos identificados e área total de compostos para os morangos dos grupos controle, QG e QGE ao longo do tempo.

Grupo	Número de compostos identificados	Área total (x 10 ⁶)
Controle		
Dia 0	58 ± 3 ^b	160 ± 10 ^a
Dia 6	74 ± 3 ^a	343 ± 4 ^b
Dia 12	47 ± 2 ^c	97 ± 8 ^c
QG		
Dia 0	56 ± 1 ^c	269 ± 4 ^b
Dia 6	75 ± 2 ^a	543 ± 20 ^a
Dia 12	62 ± 3 ^b	249 ± 13 ^b
QGE		
Dia 0	55 ± 4 ^b	333 ± 12 ^a
Dia 6	60 ± 1 ^b	290 ± 20 ^b
Dia 12	70 ± 4 ^a	310 ± 15 ^{ab}

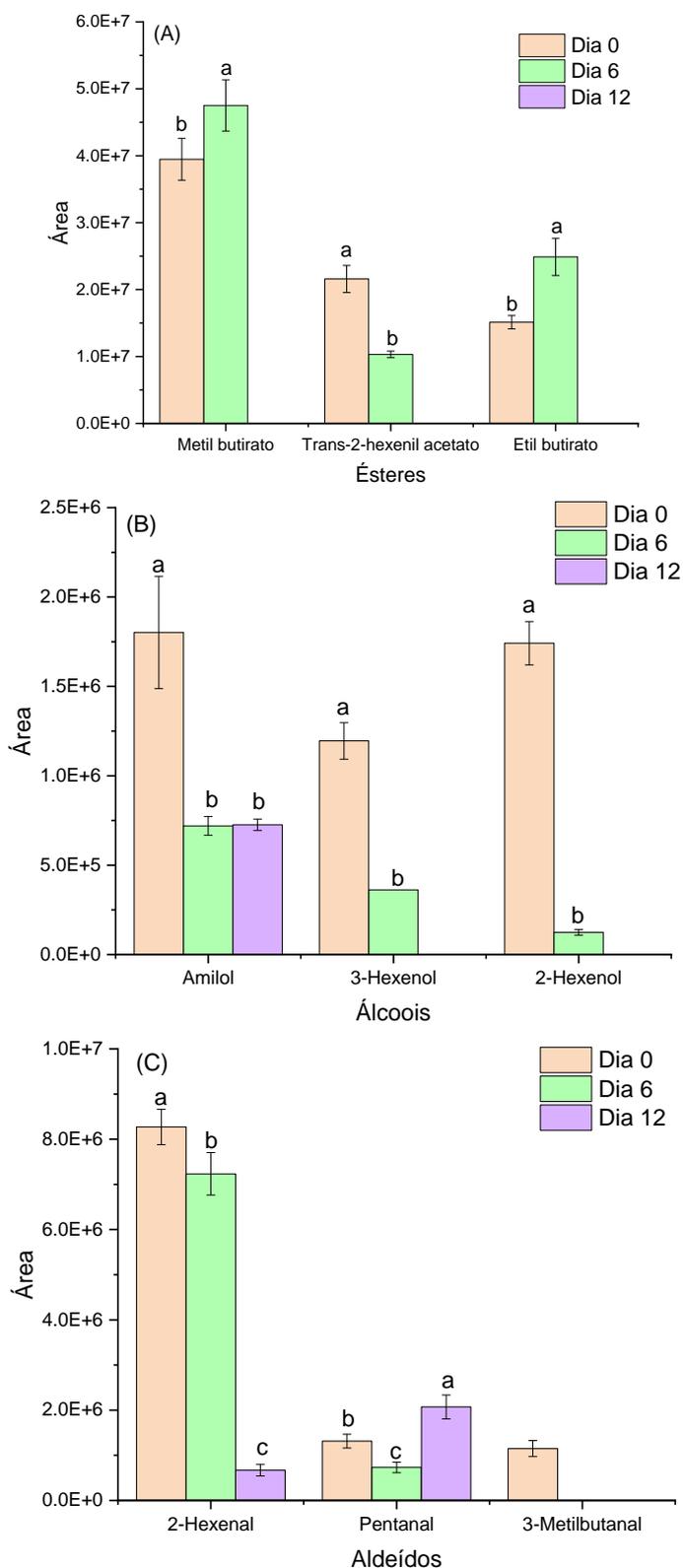
Fonte: autoria própria. Para um mesmo grupo e uma mesma coluna, diferentes letras sobrescritas indicam amostras estatisticamente diferentes por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$).

Resultados semelhantes foram reportados por Yan *et al.* (2019) para morangos recobertos com quitosana e carboximetil celulose, com reduções de 55 a 70% no número total de compostos voláteis nos frutos por eles analisados, sendo os morangos não recobertos aqueles que apresentaram a maior diminuição. Tais resultados são um primeiro indício de que os revestimentos QG e QGE

desenvolvidos neste estudo estão atuando na manutenção do perfil de voláteis dos morangos em seu período pós-colheita.

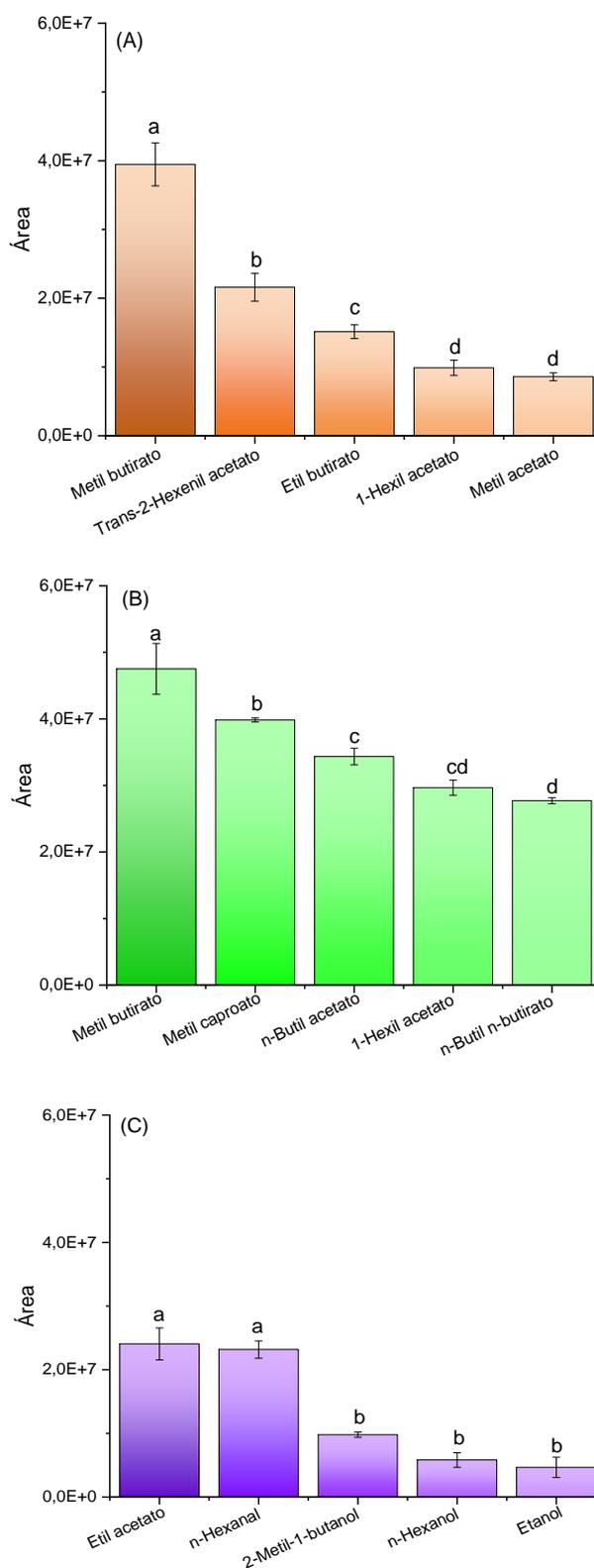
A Figura 4.6 mostra as áreas dos três ésteres (Figura 4.6(A)), álcoois (Figura 4.6(B)) e aldeídos (Figura 4.6(C)) majoritários identificados para os morangos do grupo controle, ao longo do tempo. Essas três classes químicas foram escolhidas para a discussão do perfil de voláteis dos morangos por terem sido as mais afetadas pela presença dos revestimentos e pelo tempo de armazenamento dos frutos. De forma similar, a Figura 4.7 mostra as áreas dos cinco compostos majoritários (não separados por classe química) dos morangos do grupo controle, nos dias 0 (Figura 4.7(A)), 6 (Figura 4.7(B)) e 12 (Figura 4.7(C)) de análise.

Figura 4.6. Áreas dos (A) ésteres, (B) álcoois e (C) aldeídos majoritários dos morangos do grupo controle ao longo do armazenamento.



Fonte: autoria própria. Para um mesmo composto volátil, diferentes letras sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$) ao longo dos dias de armazenamento.

Figura 4.7. Áreas dos cinco compostos majoritários dos morangos do grupo controle nos dias (A) 0, (B) 6 e (C) 12 de análise.



Fonte: autoria própria. Para um mesmo dia de análise, letras sobscritas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$).

Conforme observado no gráfico da Figura 4.6(A), os três ésteres majoritários dos morangos controle (metil butirato, *trans*-2-hexenil acetato e etil butirato) foram detectados nos dias 0 e 6, mas não no último dia de armazenamento dos frutos. Comportamento similar foi observado para dois dos álcoois majoritários (Figura 4.6(B)), o 2-hexenol e o 3-hexenol. No último dia de armazenamento dos morangos, apenas o amilol, o 2-hexenal e o pentanal puderam ser identificados, estando o amilol e o 2-hexenal em quantidades significativamente ($p \leq 0,05$) menores que aquelas encontradas nos primeiros dias de armazenamento.

A diminuição na concentração de ésteres, álcoois e aldeídos durante o armazenamento dos morangos está relacionada à senescência dos frutos, a qual leva a condições anaeróbicas de respiração (baixa concentração de O_2) e à produção de outros compostos voláteis, como éteres, aminas, terpenos, dentre outros. A contaminação microbiana também pode afetar o perfil de voláteis dos morangos, levando à produção de compostos que não se configuravam como majoritários no início do armazenamento (ALMENAR; HERNÁNDEZ-MUÑOZ; GAVARA, 2009; OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2022a; PERDONES *et al.*, 2016). Tal efeito pode ser mais bem observado nos gráficos da Figura 4.7: até o sexto dia de armazenamento, os compostos voláteis majoritários dos morangos do grupo controle eram todos ésteres, o que era esperado uma vez que eles são a classe mais abundante de compostos voláteis em morangos (ALMENAR; HERNÁNDEZ-MUÑOZ; GAVARA, 2009; CAI *et al.*, 2022). No último dia (Figura 4.7(C)), entretanto, com uma contaminação microbiana já avançada, os compostos majoritários foram o éster etil acetato, o aldeído *n*-hexanal, e os álcoois 2-metil-1-butanol, *n*-hexanol e etanol.

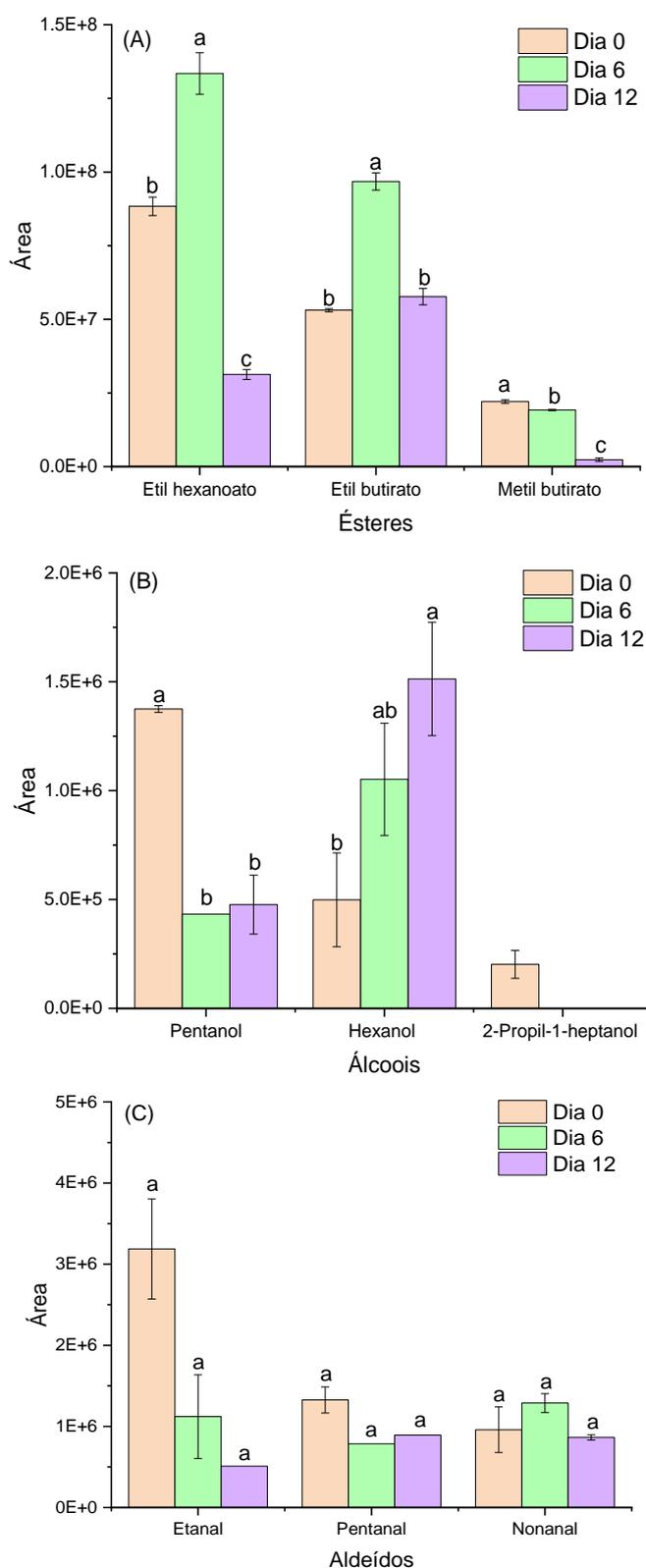
O acúmulo de etil acetato no final do armazenamento dos frutos controle pode ser explicado pela produção deste éster em condições anaeróbicas ou de super maturação. O acetaldeído é um aldeído de ocorrência natural em frutas, que tende a se acumular durante a maturação. Ele pode ser convertido em etanol pela enzima álcool desidrogenase, levando a um aumento nos níveis deste álcool no final do armazenamento dos frutos. O etanol, por sua vez, serve de substrato para a produção do etil acetato, o que explica o acúmulo deste éster no final do armazenamento e a consequente redução na produção de outros ésteres, como os metílicos, butílicos e hexílicos (ALMENAR; HERNÁNDEZ-MUÑOZ; GAVARA, 2009). O aumento de outros ésteres etílicos, como o etil pentanoato, butirato e propioano,

também foi reportado para os morangos embalados de Cai *et al.* (2022). Os autores relacionaram esse fenômeno à perda do aroma típico dos morangos e à produção de compostos de aroma desagradável, os chamados *off-flavors*.

Outro resultado interessante que aponta para a senescência dos frutos controle é o acúmulo de *n*-hexanol. Durante a senescência, a quebra da membrana celular nos frutos leva à liberação de ácidos graxos, os quais aumentam a peroxidação lipídica e a biossíntese de álcoois de seis átomos de carbono (PEREZ *et al.*, 1999). A presença do *n*-hexanal como segundo composto majoritário no último dia de armazenamento dos frutos também pode ser explicada, uma vez que este aldeído é produzido naturalmente pela oxidação dos ácidos linoleico e linolênico e então é metabolizado para a produção de álcoois e ésteres (principalmente seus correspondentes, *n*-hexanol e hexil acetato, respectivamente) (ALMENAR; HERNÁNDEZ-MUÑOZ; GAVARA, 2009).

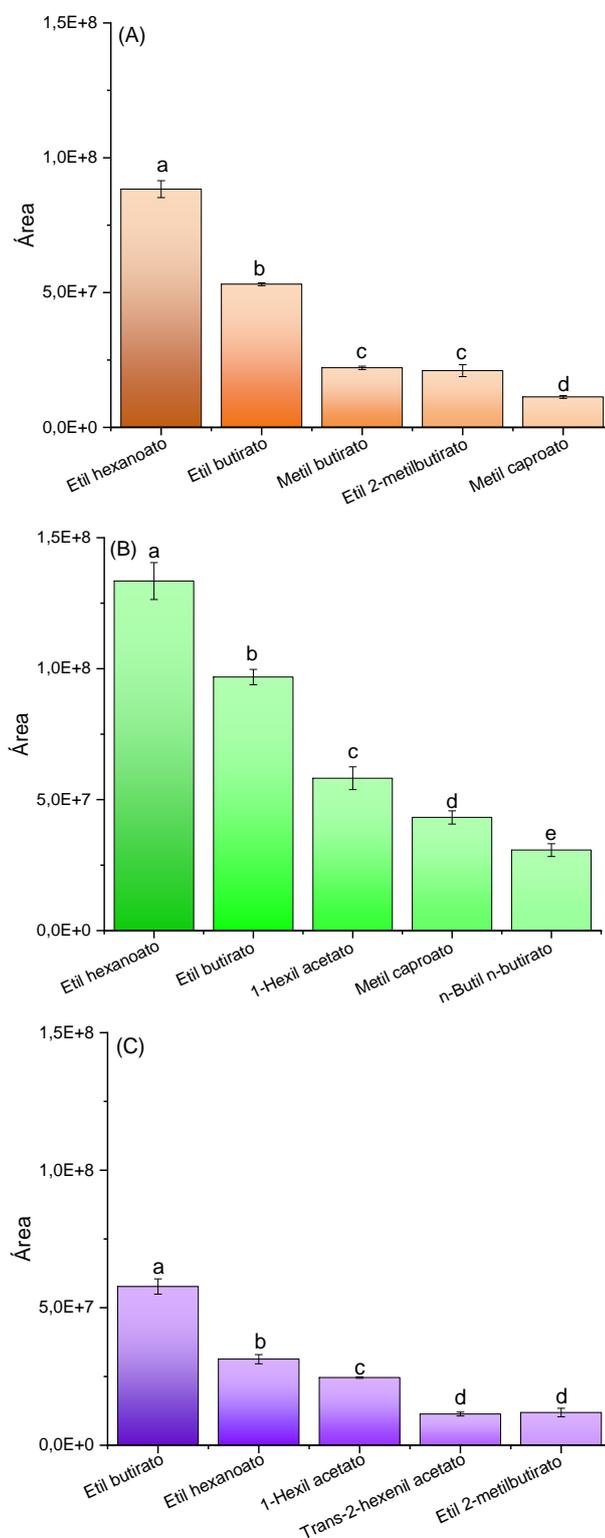
Os gráficos da Figura 4.8 mostram os três ésteres (Figura 4.8(A)), álcoois (Figura 4.8(B)) e aldeídos (Figura 4.8(C)) majoritários dos morangos do grupo QG, ao longo do armazenamento. A grande maioria dos compostos voláteis ainda pôde ser encontrada no último dia de armazenamento, ao contrário do que foi observado para os morangos do grupo controle. Tal resultado confirma o que foi observado para o número total de compostos voláteis e para a área total dos voláteis apresentados na Tabela 4.5.

Figura 4.8. Áreas dos (A) ésteres, (B) álcoois e (C) aldeídos majoritários dos morangos do grupo QG ao longo do armazenamento.



Fonte: autoria própria. Para um mesmo composto volátil, diferentes letras sobscritas indicam diferenças estatisticamente significativas por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$) ao longo dos dias de armazenamento.

Figura 4.9. Áreas dos cinco compostos majoritários dos morangos do grupo QG nos dias (A) 0, (B) 6 e (C) 12 de análise.



Fonte: autoria própria. Para um mesmo dia de análise, letras sobreescritas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$).

Dentre os ésteres majoritários dos morangos revestidos por QG, encontram-se o etil butirato e o metil butirato, os quais também foram observados para os morangos controle. No caso dos morangos do grupo QG, os ésteres etil hexanoato e etil butirato apresentaram uma tendência de aumento no sexto dia de armazenamento, seguida por uma diminuição no último dia (Figura 4.8(A)). Os álcoois majoritários, entretanto, foram totalmente diferentes dos observados para os frutos controle (Figura 4.8(B)). É válido notar que, enquanto o pentanol apresentou uma diminuição em sua área nos cromatogramas, o *n*-hexanol apresentou uma tendência de aumento ao longo do armazenamento, o que também já era esperado conforme explicado no parágrafo anterior. As áreas dos aldeídos, de modo geral, não sofreram variações significativas (Figura 4.8(C)).

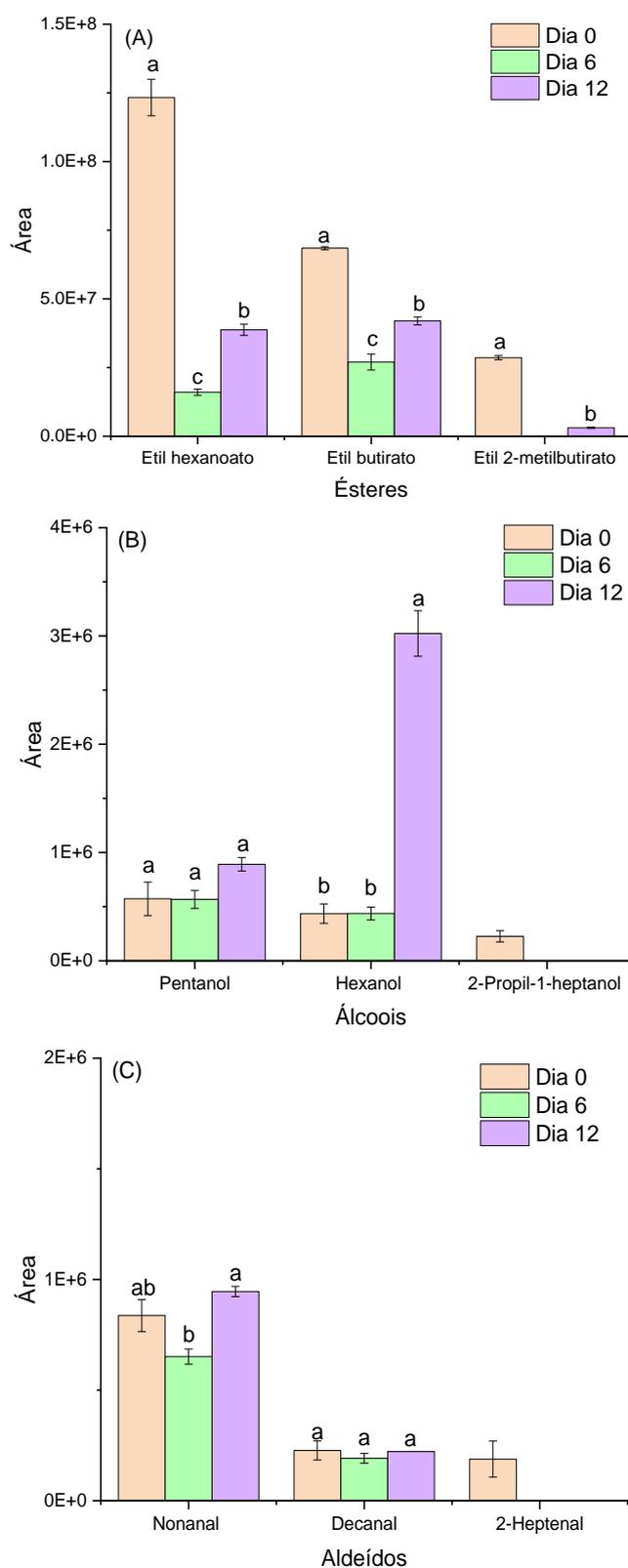
Os gráficos da Figura 4.9 apresentam os cinco compostos voláteis majoritários dos morangos revestidos por QG nos diferentes dias de armazenamento. No décimo segundo dia de armazenamento, os compostos majoritários dos frutos ainda eram ésteres. Nenhum dos compostos relacionados à senescência dos frutos, discutidos anteriormente (etil acetato, etanol, *n*-hexanol e *n*-hexanal), foram observados para os morangos do grupo QG, mais um indicativo de que os revestimentos à base de quitosana estão atuando atrasando a contaminação e a deterioração dos morangos e mantendo seu perfil de compostos voláteis mais estável ao longo do tempo.

Os gráficos das Figuras 4.10 e 4.11 mostram os compostos majoritários dos morangos do grupo QGE separados por classe química e por tempo de armazenamento, respectivamente. De forma geral, os ésteres majoritários destes morangos (Figura 4.10(A)) apresentaram uma tendência de diminuição no sexto dia de armazenamento, seguida por um novo aumento no final do armazenamento. O etil hexanoato e o etil butirato também foram os ésteres majoritários observados para os morangos revestidos por QG. O *n*-hexanol e o pentanol, dois dos álcoois majoritários de QG, também foram os majoritários de QGE. O pentanol não apresentou variação significativa ao longo do tempo, já o *n*-hexanol apresentou um aumento significativo ($p \leq 0,05$) no último dia de armazenamento, conforme observado e explicado anteriormente. Os aldeídos também não apresentaram variações significativas.

Em relação ao tempo de armazenamento, a mesma tendência dos morangos do grupo QG foi observada para os frutos revestidos por QGE. No décimo segundo

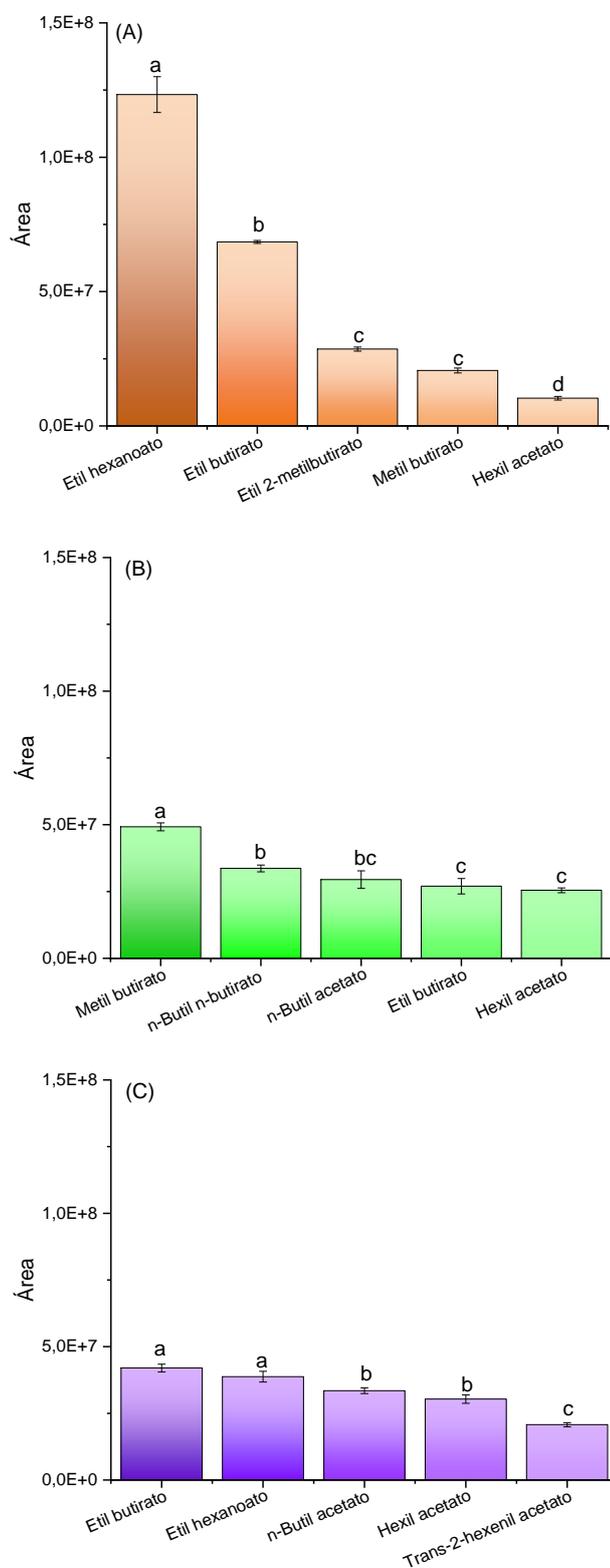
dia de análise, os cinco compostos majoritários dos morangos ainda eram exclusivamente ésteres, sendo 4 deles em comum entre os dois grupos revestidos (etil butirato, etil hexanoato, hexil acetato e *trans*-2-hexenil acetato). Almenar, Hernández-Muñoz e Gavara (2009) também reportaram aumento na concentração dos ésteres hexil acetato, etil butirato e etil hexanoato em seus morangos revestidos com solução de quitosana em ácido acético, ao longo do armazenamento. Perdonés *et al.* (2016), que também utilizaram revestimentos à base de quitosana para morangos, reportaram a mesma tendência de mudança dos compostos voláteis majoritários ao longo do tempo de armazenamento, levando a perfis de compostos voláteis semelhantes para os morangos revestidos ao final do armazenamento.

Figura 4.10. Áreas dos (A) ésteres, (B) álcoois e (C) aldeídos majoritários dos morangos do grupo QGE ao longo do armazenamento.



Fonte: autoria própria. Para um mesmo composto volátil, diferentes letras sobscritas indicam diferenças estatisticamente significativas por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$) ao longo dos dias de armazenamento.

Figura 4.11. Áreas dos cinco compostos majoritários dos morangos do grupo QGE nos dias (A) 0, (B) 6 e (C) 12 de análise.



Fonte: autoria própria. Para um mesmo dia de análise, letras sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$).

3.5 Teste do desafio

A influência dos revestimentos sobre o controle da proliferação fúngica nos morangos se deu pela aplicação dos esporos dos fungos *R. stolonifer* e *B. cinerea* nos frutos revestidos e não revestidos e pela análise da severidade de suas lesões ao longo dos 12 dias de armazenamento. A Figura 4.12(A) mostra a escala de severidade adotada para os morangos contaminados com o fungo *R. stolonifer*, relacionada à área do fruto contaminada. Da mesma forma, a Figura 4.12(B) mostra a escala de severidade para o fungo *B. cinerea*. Quanto mais eficaz o revestimento, melhor sua propriedade de barreira contra o espalhamento da lesão promovida e menores os valores atribuídos para os morangos ao longo de seu armazenamento.

Figura 4.12. Escalas de severidade adotadas para os morangos lesionados com: (A) esporos do fungo *R. stolonifer* e (B) esporos do fungo *B. cinerea*.

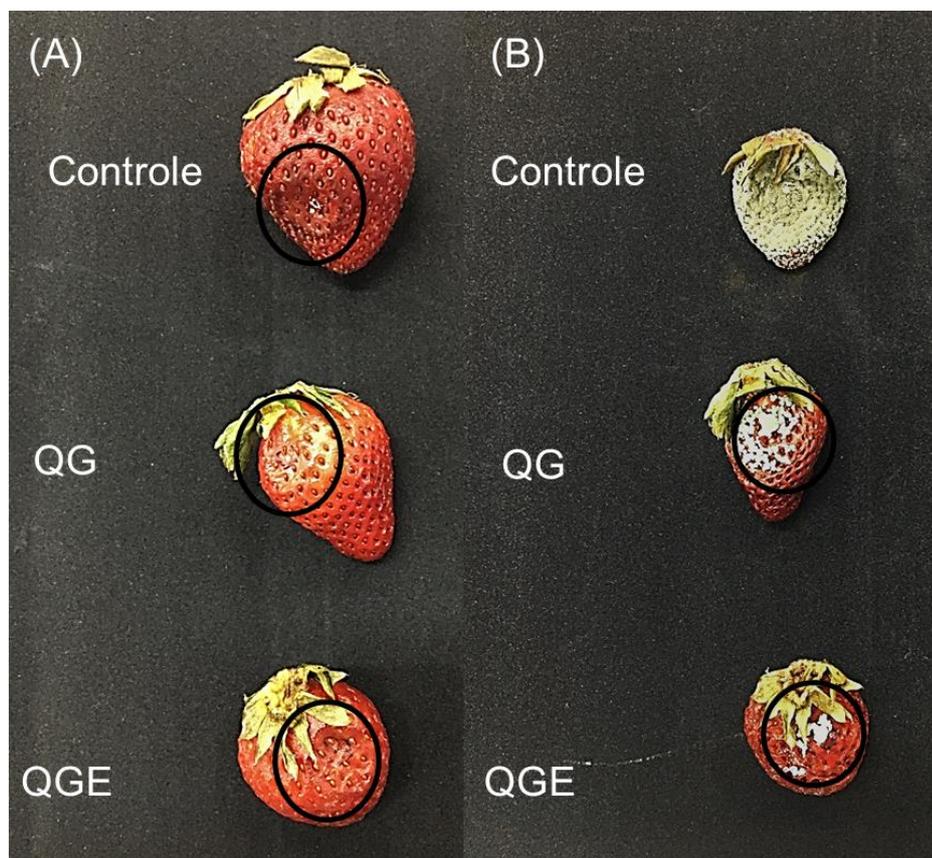


Fonte: autoria própria.

Conforme esperado, a presença dos revestimentos de quitosana/gelatina e de quitosana/gelatina/extrato de casca de romã retardaram o desenvolvimento das lesões para ambos os fungos inoculados. A Figura 4.13 compara os mesmos frutos nos dias 3 (Figura 4.13(A)) e 9 (Figura 4.13(B)) do armazenamento, todos contaminados com o fungo *R. stolonifer*. É possível verificar que, enquanto o morango do grupo controle já se apresentava totalmente contaminado (ou seja, no grau 5 da escala de severidade) no dia 9, os morangos revestidos ainda

apresentavam regiões não lesionadas. Nesse mesmo dia, foram atribuídos os valores de severidade 2 para o morango revestido com QG, e 1 para o morango revestido com QGE.

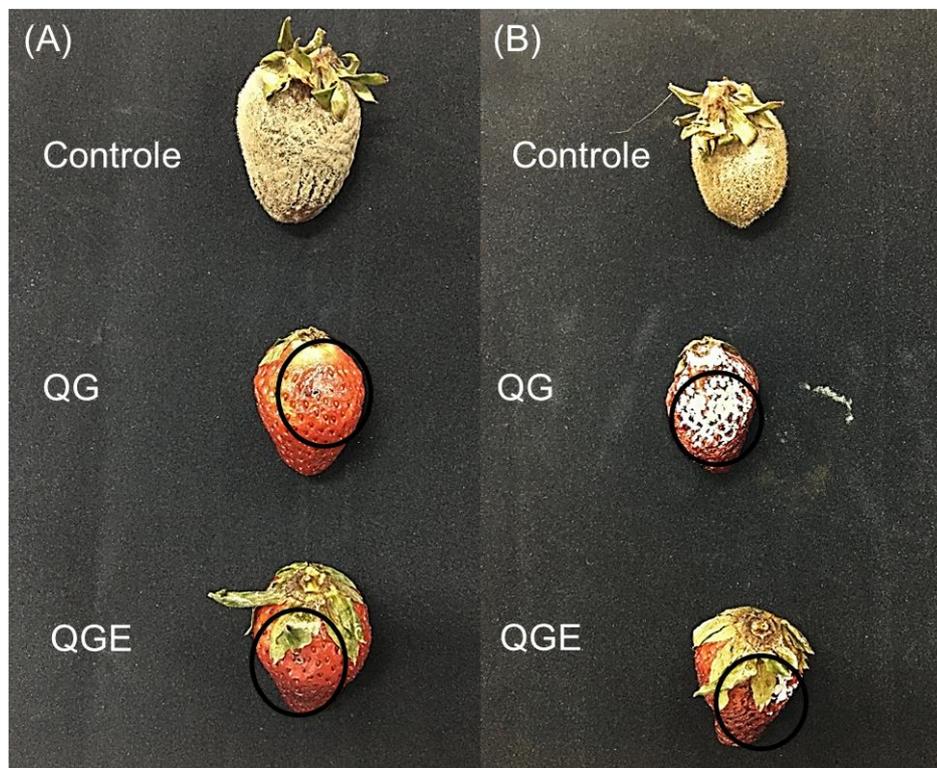
Figura 4.13. Comparativo dos morangos revestidos e não revestidos lesionados com o fungo *R. stolonifer* nos dias (A) 3 e (B) 9 do armazenamento.



Fonte: autoria própria.

Do mesmo modo, a Figura 4.14 mostra os frutos, também nos dias 3 (Figura 4.14(A)) e 9 (Figura 4.14(B)) do armazenamento, contaminados com o fungo *B. cinerea*. O morango do grupo controle também apresentou 100% de deterioração no nono dia de armazenamento, enquanto para os morangos dos grupos QG e QGE foram atribuídas as severidades 3 e 2, respectivamente.

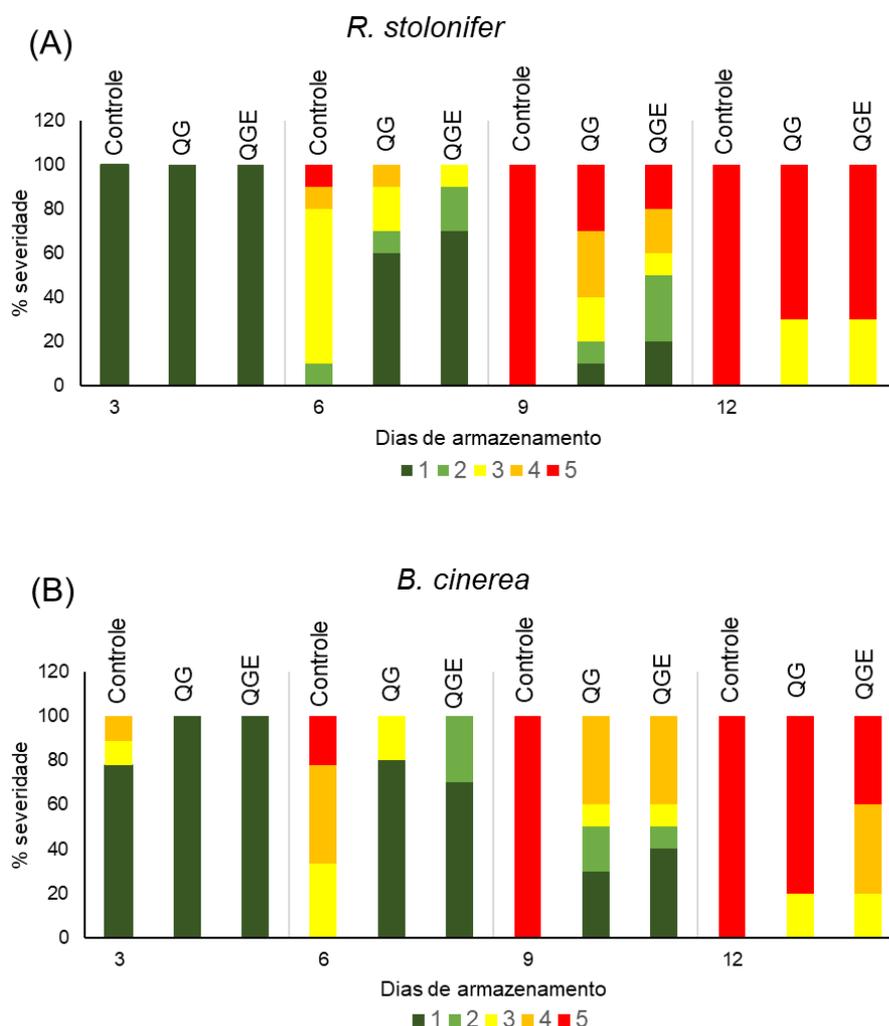
Figura 4.14. Comparativo dos morangos revestidos e não revestidos lesionados com o fungo *B. cinerea* nos dias (A) 3 e (B) 9 do armazenamento.



Fonte: autoria própria.

Para ilustrar melhor o controle dos revestimentos sobre as lesões nos morangos, os gráficos de barra da Figura 4.15 mostram a escala de severidade em cores. Na Figura 4.15(A) observa-se que 70% dos morangos do grupo controle contaminados com o fungo *R. stolonifer* passaram da severidade 1 (verde escuro) para a severidade 3 (amarelo claro) do dia 3 para o dia 6 de armazenamento. No dia 9, 100% destes frutos já se encontravam na mais alta severidade da lesão (5), representada pela cor vermelha. Por outro lado, nesse mesmo dia ainda foram encontrados 10% de morangos no grau 1 de severidade (verde escuro) para os frutos revestidos com QG, e 20% de morangos nesse mesmo grau para os frutos revestidos com QGE. Estes resultados são, mais uma vez, uma evidência de que os revestimentos puderam retardar o desenvolvimento das lesões microbianas. No último dia, 30% dos frutos revestidos, tanto com QG quanto com QGE, ainda se encontravam no meio da escala de severidade (grau 3, amarelo claro).

Figura 4.15. Gráficos de barras com a escala de severidade das lesões representada por cores, para os morangos contaminados com: (A) *R. stolonifer* e (B) *B. cinerea*.



Fonte: autoria própria.

No caso dos frutos contaminados com o fungo *B. cinerea* (Figura 4.15(B)), os resultados foram ainda mais promissores. O grau mais alto de severidade só foi observado no último dia de armazenamento para os frutos revestidos, tanto para QG quanto para QGE, sendo que 100% dos frutos controles já se encontravam totalmente contaminados desde o dia 9. Além disso, apenas 40% dos frutos revestidos com QGE apresentaram a lesão mais severa no dia 12, metade da porcentagem dos frutos revestidos com QG encontrados nesse grau de severidade, nesse mesmo dia (80%).

3.6 Análise sensorial

O teste sensorial de diferença do controle foi aplicado com 19 avaliadores treinados, para avaliação da existência de diferença entre os morangos revestidos e os morangos não revestidos, em termos globais (aparência, odor, gosto, sabor). Para cada avaliador, foram servidas uma amostra controle (P, morango não revestido), e três amostras testes, sendo elas: um morango não revestido (igual ao controle), um morango revestido com QG e um morango revestido com QGE (Figura 4.16).

Figura 4.16. Cabine de aplicação do teste sensorial para os morangos.



Fonte: autoria própria.

A Tabela 4.6 apresenta a média dos valores (de 1 a 9) atribuídos pelos avaliadores aos morangos dos três grupos durante o teste sensorial. Os valores ficaram muito próximos uns dos outros e indicam que, em termos globais, os avaliadores julgaram que os morangos eram “ligeiramente melhores que P” (nota 4) ou que “não há diferença entre P e as amostras” (nota 5). É importante ressaltar que os morangos do grupo QGE apresentaram a média mais próxima do valor 4, sendo, de forma geral, considerados melhores que os morangos dos demais grupos.

Tabela 4.6. Média dos valores atribuídos para os morangos revestidos e não revestidos no teste sensorial de diferença do controle.

Amostra	Controle	QG	QGE
Média	4,63 ± 1,06	4,79 ± 1,47	4,37 ± 1,61

Fonte: autoria própria.

Os resultados da ANOVA dos valores atribuídos aos morangos dos três grupos encontram-se na Tabela 4.7. Considerando-se que o valor de F tabelado para 2 graus de liberdade da amostra e 36 graus de liberdade do resíduo ($F_{(2;36)}$) é igual a 3,27, e que o F calculado foi de 0,65, pode-se afirmar que não houve diferença significativa entre as amostras a 95% de confiança, uma vez que $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$. Tal resultado indica que os avaliadores realmente não puderam afirmar se havia ou não diferença entre as amostras de morangos revestidos e não revestidos em termos globais (aparência, odor, gosto, sabor), o que é mais um resultado positivo para a aplicação dos revestimentos no período pós-colheita dos morangos.

Tabela 4.7. Resultados da ANOVA aplicada aos valores atribuídos pelos provadores aos morangos no teste sensorial de diferença do controle.

Causas da variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F
Amostra	2	1,72	0,86	0,65*
Avaliador	18	58,39	3,24	2,45
Resíduo	36	47,61	1,32	
TOTAL	56	107,72		

Fonte: autoria própria. F tabelado para 2 graus de liberdade da amostra e 36 graus de liberdade do resíduo = 3,27. *Não significativo a 5% de probabilidade.

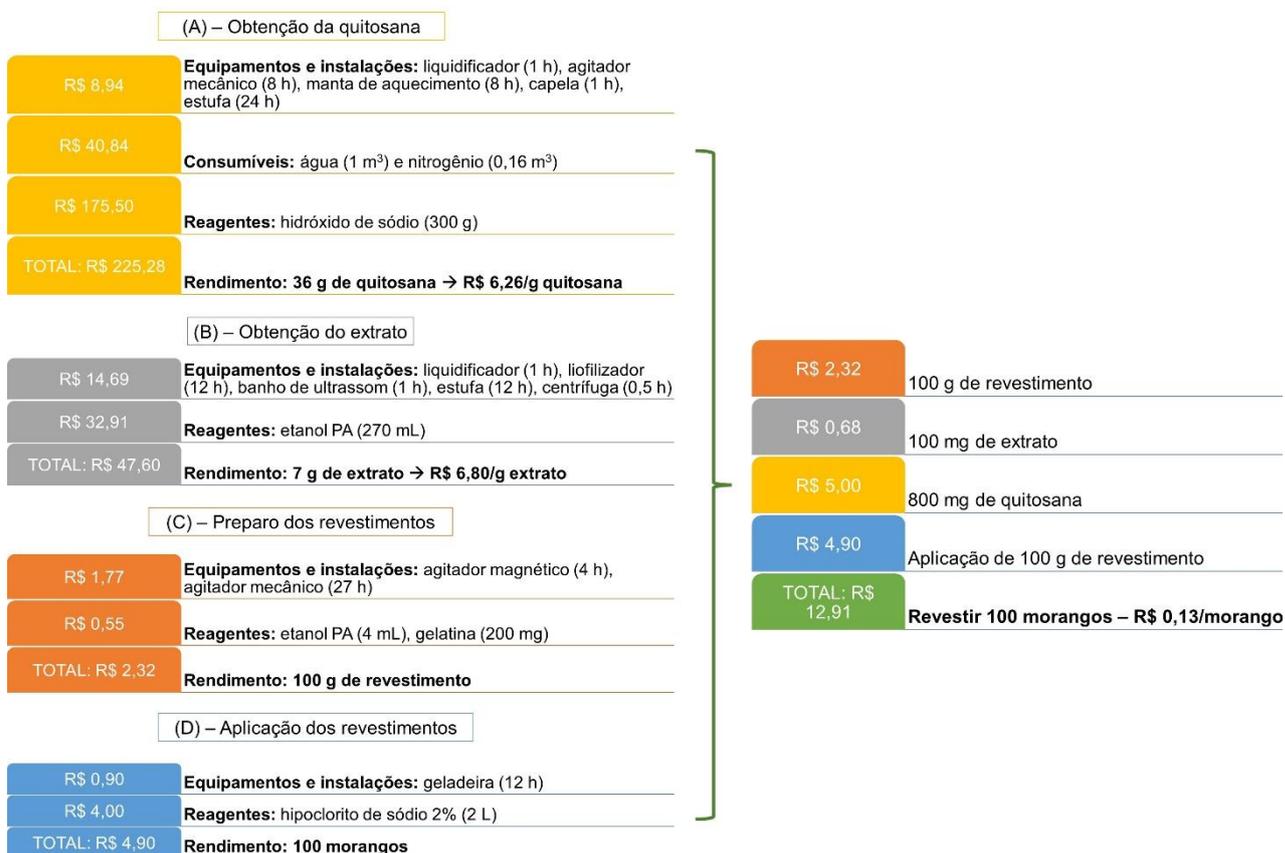
3.7 Estimativa do custo dos revestimentos

Para a estimativa do custo dos revestimentos dos morangos, considerou-se as quatro etapas principais em que o processo laboratorial foi dividido: (A) obtenção da quitosana, (B) obtenção do extrato de casca de romã, (C) preparo dos revestimentos QGE e (D) aplicação dos revestimentos nos morangos. Os cálculos foram feitos com base no revestimento de 100 morangos e considerando-se a proporção de 1 g de QGE para cada fruto. A Figura 4.17 mostra os principais gastos envolvidos em cada uma das quatro etapas.

Considerando-se os gastos com energia elétrica (e a potência dos equipamentos utilizados nas quatro etapas do processo), consumíveis como água e gases, e reagentes, o custo envolvido no preparo e na aplicação do revestimento QGE nos morangos é de aproximadamente R\$ 0,13 por fruto. Para essa estimativa, não foram adicionados os gastos com mão de obra ou de depreciação dos equipamentos, os quais devem ser considerados caso haja um escalonamento do processo. O revestimento de 100 morangos é viável de ser conduzido em escala

laboratorial, e o escalonamento envolveria gastos extras com estoque, transporte, logística, dentre outros.

Figura 4.17. Estimativa do custo das principais etapas envolvidas na produção e na aplicação dos revestimentos dos morangos.



Fonte: autoria própria.

Outro fator de extrema importância para a obtenção de um custo final viável foi o uso de resíduos para a obtenção da quitosana (proveniente de gládios de lula) e do extrato de casca de romã. Caso fosse usada uma quitosana comercial (custo de cerca R\$ 8,50 – R\$ 12,50 por g de quitosana), o valor do uso da quitosana para o preparo de 100 g de revestimento aumentaria de R\$ 5,00 (Figura 4.17) para R\$ 8,00 – R\$ 10,00. Por fim, é importante destacar que o aumento no valor dos frutos com a aplicação dos revestimentos pode ser compensado pelo aumento em 6-8 dias no seu tempo de armazenamento, conforme visto na seção 3.1.

4. CONCLUSÕES

Esta etapa da pesquisa envolveu a aplicação dos revestimentos QG e QGE, desenvolvidos, otimizados e caracterizados nos capítulos anteriores, em morangos. Os resultados apontaram para a formação de uma barreira semipermeável pelos revestimentos poliméricos, a qual protegeu os morangos contra a desidratação e o ataque de microrganismos. Mais de 90% dos morangos não revestidos foram deteriorados ao final dos 12 dias de armazenamento refrigerado, o que justifica seus menores teores de sólidos solúveis (maior conversão dos açúcares durante o metabolismo) e seus menores valores de pH (devido aos metabólitos ácidos produzidos pelos fungos). A coloração e a firmeza dos morangos revestidos mantiveram-se estáveis e os revestimentos também retardaram as quedas nas taxas respiratórias dos frutos. Os morangos do grupo QGE apresentaram ainda maiores teores de compostos bioativos (fenólicos totais, antocianinas e vitamina C) ao final de seu armazenamento, o que afeta de maneira positiva a aceitação sensorial e o perfil nutricional dos frutos. Os morangos não revestidos apresentaram uma queda de cerca de 39% na área total de seus compostos voláteis, e a presença de compostos como etil acetato, hexanal e hexanol no final de seu armazenamento indicou condições de respiração anaeróbica e contaminação microbiana. Os revestimentos também retardaram o desenvolvimento das lesões por fungos inoculados nos morangos, sendo que os frutos não revestidos se apresentaram 100% contaminados no nono dia de armazenamento. Os resultados do teste sensorial de diferença do controle não apontaram a existência de diferença significativa, em termos globais, entre os frutos revestidos e não revestidos, ou seja, os provadores não conseguiram diferenciar os frutos não recobertos dos recobertos com QG e QGE. Por fim, a aplicação dos revestimentos nos frutos levaria a um aumento de apenas R\$ 0,13/fruto, considerando-se todas as etapas de obtenção, preparo e aplicação dos materiais.

CAPÍTULO 5

***NOVAS POSSIBILIDADES: EFEITO FOTO
ANTIMICROBIANO DOS REVESTIMENTOS
DE QUITOSANA, GELATINA E EXTRATO
DE CASCA DE ROMÃ NA QUALIDADE
PÓS-COLHEITA DE MORANGOS***

1. INTRODUÇÃO

A contaminação microbiana é um problema sério em todo o mundo, especialmente na indústria de alimentos (DELGADO; SCHUSTER; TORERO, 2021; DIAS *et al.*, 2022). Por ano, é descartado aproximadamente um terço de todos os alimentos produzidos globalmente, o que equivale a cerca de 1,3 bilhão de toneladas (DELGADO; SCHUSTER; TORERO, 2021; ELMASSRY; ZAYED; FARAG, 2020). As consequências da elevada contaminação microbiana na indústria alimentícia não são apenas econômicas, mas também sociais, levando-se em consideração as milhares de hospitalizações pela ingestão de alimentos contaminados com microrganismos patogênicos (BINTSIS, 2017; THAKALI; MACRAE, 2021).

Considerando a ameaça que essas contaminações podem representar, tanto para a perda de alimentos quanto para a saúde humana, há uma necessidade urgente pelo desenvolvimento de estratégias de combate de microrganismos deteriorantes e patogênicos em alimentos. Nesse sentido, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (da sigla em inglês aPDT, *antimicrobial photodynamic therapy*) tem ganhado repercussão científica e prática devido às suas características de alta precisão, não invasividade, alta eficiência, controlabilidade, possibilidade de repetição do tratamento, baixa toxicidade, além de seu baixo custo (LIU *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2021b).

A terapia fotodinâmica requer o uso de uma fonte de luz com comprimento de onda específico e uma molécula fotossensibilizadora (DIAS *et al.*, 2022). A ação da luz sobre essa molécula produz as chamadas espécies reativas de oxigênio (ERO), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), íon superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$) e oxigênio singlete (1O_2), as quais são citotóxicas e capazes de matar os microrganismos quando em contato com elas (DIAS *et al.*, 2020; HU *et al.*, 2018). Além de ser amplamente utilizada para aplicações médicas, como infecções e câncer (ARCIOLA *et al.*, 2018; STEWART, BJARNSHOLT, 2020), muitos estudos recentes têm se concentrado no desenvolvimento e aprimoramento da aPDT para a descontaminação de alimentos (AALIYA *et al.*, 2021; DIAS *et al.*, 2022; NOTTAGH *et al.*, 2020).

Tao *et al.* (2018) avaliaram os efeitos da terapia fotodinâmica sobre a qualidade de fatias de maçã recobertas com curcumina durante seu armazenamento, reportando inativação microbiana em sua superfície. As propriedades antioxidantes e nutricionais da fruta não foram afetadas negativamente pelo tratamento. Assim, uma maneira de aprofundar os estudos de terapia fotodinâmica visando reduzir a perda de alimentos é pela associação entre este tratamento e o uso de revestimentos poliméricos comestíveis funcionalizados com fotossensibilizadores, para a produção de filmes inovadores e eficientes. Dias *et al.* (2022) reportaram a eficiência da foto inativação bacteriana em filmes de quitosana e gelatina contendo curcumina e extrato de casca de romã como fotossensibilizadores e concluíram que ambos os materiais foram promissores para a aplicação proposta, podendo ser utilizados como revestimentos de alimentos.

Assim, o objetivo geral deste capítulo foi o de aliar a terapia fotodinâmica com o uso dos revestimentos comestíveis à base de quitosana, gelatina e extrato de casca de romã, desenvolvidos e aplicados em morangos como descrito nos capítulos anteriores, para a melhoria da inativação microbiana dos frutos. Os resultados aqui descritos podem ser encontrados no artigo intitulado: “*Photoantimicrobial chitosan-gelatin-pomegranate peel extract films for strawberries preservation: From microbiological analysis to in vivo safety assessment*”, que foi publicado no periódico internacional *International Journal of Biological Macromolecules* (fator de impacto = 8,2 em 2023) (Anexo IV desta tese).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Neste capítulo, foram utilizados tanto os filmes quanto as soluções formadoras dos revestimentos QG (0,8% quitosana, 0,2% gelatina) e QGE (0,8% quitosana, 0,2% gelatina e 1 mg g⁻¹ extrato de casca de romã), preparados e caracterizados conforme descrito nos capítulos anteriores. Todos os solventes e reagentes utilizados nas preparações e caracterizações foram de grau PA ou superior e utilizados como tal. Todos os ensaios descritos neste capítulo foram conduzidos no Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP).

2.2 Fotodegradação do extrato de casca de romã e dos revestimentos

Para avaliar a capacidade fotossensível do extrato de casca de romã na inibição de microrganismos, foram conduzidos testes de fotodegradação com o extrato, bem como com o filme QGE. Para tanto, as amostras foram submetidas à aplicação de luz verde com um aparelho Biotable® (525 nm, 8,8 mW cm⁻²), em doses cumulativas (de 0 a 30 J cm⁻² para uma solução etanólica do extrato a 250 µg mL⁻¹, e de 0 a 100 J cm⁻² para o filme QGE), determinadas experimentalmente para cada material. O comprimento de onda de 525 nm foi escolhido por ser apropriado para ativar a cianidina-3-glucosídeo, antocianina predominante do extrato de casca de romã (BERTOLO *et al.*, 2023). O tempo de aplicação da luz, necessário para atingir cada dose, foi determinado de acordo com a calibração diária da potência do equipamento. A cada dose de luz aplicada, foram obtidos espectros de absorção UV-Vis do extrato (460-800 nm) e espectros de fluorescência de QGE (530-800 nm), com a finalidade de se monitorar o decaimento da absorbância dos materiais de acordo com a aplicação da luz.

A porcentagem de fotodegradação do extrato foi calculada pela Equação (5.1), em que $Abs_{inicial}/Abs_{final}$ é a absorbância do extrato em 540 nm, antes e após a aplicação de cada dose de luz, respectivamente. Da mesma forma, o percentual de fotodegradação do filme QGE foi calculado de acordo com a Equação (5.2), em que $Intensidade_{inicial}/Intensidade_{final}$ é a intensidade de fluorescência do filme antes e após a aplicação de luz, também em 540 nm.

$$\text{Fotodegradação do extrato (\%)} = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{inicial}} - \text{Abs}_{\text{final}}}{\text{Abs}_{\text{inicial}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação (5.1)}$$

$$\text{Fotodegradação de QGE (\%)} = \left(\frac{\text{Intensidade}_{\text{inicial}} - \text{Intensidade}_{\text{final}}}{\text{Intensidade}_{\text{inicial}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação (5.2)}$$

2.3 Foto inativação de *S. aureus* pelo extrato de casca de romã e pelos revestimentos

Para a determinação da atividade antimicrobiana dos materiais sob a aplicação de luz, conduziu-se o teste de inativação fotodinâmica (ou foto inativação) contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), conforme procedimento descrito por Dias, Corrêa e Bagnato (2021). Para tanto, 1 mL da suspensão de bactérias (10^8 UFC mL⁻¹) foi colocado em contato com o extrato (nas concentrações de 2,5, 5 e 10 mg mL⁻¹) e com os filmes QG e QGE (25 mm²) por 10 min, em uma placa de 24 poços, para a adesão das bactérias aos materiais. O filme QG, apesar da ausência do extrato de casca de romã como fotossensibilizador, também foi analisado para avaliação da atividade antimicrobiana intrínseca da quitosana. Após 10 min, as amostras foram transferidas para outra placa e submetidas à irradiação de luz (525 nm, 50 J cm⁻²) em um aparelho Biotable®. Para cada material, havia um controle correspondente no escuro, isto é, sem aplicação de luz.

Em seguida, para o descolamento das células, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio com 1 mL de solução salina estéril e agitadas em vórtex por 30 s. Para a determinação da sobrevivência das bactérias, as amostras foram diluídas seriadamente (1:10) em solução salina estéril e espalhadas sobre as superfícies de placas de ágar *Brain Heart Infusion* (BHI). Após incubação (37 °C, 24 h), as unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹) foram determinadas. Cada amostra foi analisada em duplicata em três ocasiões distintas (n = 6).

2.4 Fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos revestimentos

As sementes da variedade Baia Periforme de *Allium cepa*, isentas de agrotóxicos, foram adquiridas da Isla Sementes LTDA (Porto Alegre, RS, Brasil). Os testes com *A. cepa* foram feitos de acordo com protocolos estabelecidos na literatura (DIAS *et al.*, 2020; LEME; MARIN-MORALES, 2009; SCHERER *et al.*, 2019). As sementes foram colocadas em contato com as soluções formadoras de filme QG e

QGE nas concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500 mg L⁻¹. Água destilada e o herbicida trifluralina (TRF) (0,84 mg L⁻¹) foram aplicados como controles negativo (CN) e positivo (CP), respectivamente.

Para a germinação das sementes, feita em triplicata com 30 sementes em cada tratamento, as amostras foram deixadas a 23 ± 5 °C com fotoperíodo 12/12 h e UR de 60 ± 5%, por 96 h. A fitotoxicidade foi analisada pela taxa de germinação (TG), calculada pela Equação (5.3) após 96 h. O índice de alongamento radicular (IAR), com saliência visível, foi medido com um paquímetro digital Digimess.

$$TG = \left(\frac{\text{Total sementes germinadas}}{\text{Total sementes utilizadas}} \right) \times 100 \quad \text{Equação (5.3)}$$

O índice mitótico (IM) e as frequências de anomalia cromossômica (FAC) e de micronúcleo (FMA) foram determinados pelas Equações (5.4), (5.5) e (5.6), representando a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, respectivamente. As raízes coletadas foram fixadas em solução Carnoy 3:1 (álcool etílico/ácido acético) por 8 h, transferidas para o fixador Carnoy e armazenadas a 4 °C. As raízes fixadas foram lavadas com água destilada e hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 1 mol L⁻¹ a 60 °C por 10 min. Posteriormente, foram lavadas e coradas com reagente de Schiff por 2 h e então mantidas protegidas da luz. Após a coloração, os meristemas radiculares foram colocados em lâminas, às quais foi adicionada uma gota de carmim acético 45% e, a seguir, cobertos com lamínulas e então levemente triturados. Para cada tratamento, 5 lâminas foram preparadas e fotografadas usando um microscópio óptico Nikon com ampliação de 400x (Nikon CFI60, Eclipse Ti-S, Tóquio, Japão). Na análise das imagens foram utilizadas 1000 células em cada lâmina, totalizando 5000 células por tratamento. A versão FiJi do *software* Image J foi utilizada como principal plataforma de análise de imagens.

$$IM = \left(\frac{\text{Total de células divididas}}{\text{Total de células observadas}} \right) \times 100 \quad \text{Equação (5.4)}$$

$$FAC = \left(\frac{\text{Total de células com abnormalidade}}{\text{Total de células observadas}} \right) \times 100 \quad \text{Equação (5.5)}$$

$$FMA = \left(\frac{\text{Total de células com micronúcleos}}{\text{Total de células observadas}} \right) \times 100 \quad \text{Equação (5.6)}$$

2.5 Ensaio *in vivo* com peixe-zebra

As espécies *Danio rerio* (peixe-zebra) (1,5-2,0 cm de comprimento, macho e fêmea) foram aclimatadas em condições de laboratório por 15 dias. A manutenção dos peixes foi feita seguindo a metodologia estabelecida pela OECD 203 (KITANO, 1992), com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo, protocolo CEUA 2952290621, sob responsabilidade do Dr. Lucas Danilo Dias (Anexo V). Os peixes foram cultivados coletivamente em um aquário de 50 L (50 x 25 x 40 cm), acoplado a um sistema de filtração e aeração contínua. Os parâmetros para manutenção da espécie foram: água sem cloro, fotoperíodo 12/12 h, filtração, aeração contínua, pH $7,0 \pm 0,5$ e temperatura 27 ± 1 °C. Durante todo o processo de aclimação, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia através de comedouro automático (Hopar Automatic H-9000) com ração comercial (Tetramin®) (GARBUIO *et al.*, 2022).

Os testes de toxicidade foram feitos após a aclimação dos peixes, em triplicata, com os animais separados em três grupos principais ($n = 5$ peixes/grupo): 1) água (controle); 2) QGE 10, 50 e 100 mg L⁻¹; e 3) QG 100 mg L⁻¹. Os peixes foram expostos às diferentes concentrações dos grupos em recipientes de vidro com capacidade para 2 L de água reconstituída e mantidos por 96 h em condições estáticas. A mortalidade dos peixes foi monitorada cada 24 horas (24, 48, 72 e 96 h). Foram avaliados os seguintes parâmetros físico-químicos da água a cada leitura de mortalidade: oxigênio dissolvido (mg L⁻¹) (NEOFOX-KIT Oxygen Sensing System, Ocean Optics), sensor de oxigênio da sonda (FOSPOR), temperatura (°C) e potencial de hidrogênio (pH) (modelo de medidor de pH de bolso, KAVIS) (Tabela A3 nos apêndices desta tese).

2.6 Avaliação dos morangos

Para avaliação do uso da terapia fotodinâmica aliado aos revestimentos sobre as propriedades físico-químicas e microbiológicas dos morangos, seguiu-se o mesmo procedimento de aplicação dos revestimentos descrito na seção 2.1 do capítulo 4, com frutos adquiridos em comércio local (São Carlos, SP, Brasil).

2.6.1 Perda de massa, contaminação fúngica e conteúdo total de fenólicos

Uma vez recobertos, os morangos dos três grupos (controle, QG e QGE) foram pesados e divididos em outros dois grupos (escuro e claro), sendo $n = 15/\text{grupo}$. Os frutos do grupo escuro foram deixados na bancada enquanto os frutos do grupo claro foram submetidos à aplicação de luz verde (525 nm) com aparelho Biotable® (10 J cm^{-2}), por toda a superfície do fruto (Figura 5.1). Após a aplicação da luz, todos os morangos foram novamente armazenados na geladeira. A % de perda de massa e a contaminação dos frutos foram determinadas segundo os mesmos procedimentos descritos na seção 2.2 do capítulo 4 nos dias 0, 2, 4, 6 e 8 de armazenamento.

Figura 5.1. Aplicação de luz verde nos morangos com o aparelho Biotable®.



Fonte: autoria própria.

O conteúdo total de fenólicos dos morangos dos grupos controle e QGE foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, nos dias 0, 4 e 8 de armazenamento. Para tanto, os frutos foram macerados e extraídos em banho ultrassônico (Unique USC-1400A) por 15 min a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ com acetona/água 80% (v/v), na proporção de 1 g de fruto/10 mL de solução, seguindo modificações do procedimento descrito por Yu *et al.* (2021). Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi então colocado para reagir com o reagente de Folin (1:1) por 5 min, seguido da adição de uma solução de carbonato de sódio 20% (g/g) para interromper a reação. Após 15 min no escuro, a absorvância foi medida a 725 nm (espectrofotômetro Thermo Scientific™, Vantaa, Finlândia). A solução de

acetona/água foi utilizada como branco e os resultados foram expressos em $\mu\text{g EAG g}^{-1}$ morango.

2.6.2 Foto inativação de *S. aureus*

Para avaliar a foto inativação microbiana dos frutos revestidos e não revestidos, os morangos foram lavados, sanitizados e cortados em pedaços cilíndricos. O procedimento de revestimento foi feito conforme descrito na seção 2.6. Também foi preparado um grupo controle, por meio da imersão dos pedaços cilíndricos em água destilada. Após secagem por 2 h a 25 °C, os pedaços de morango foram armazenados a 4 °C e 70% UR. No dia seguinte à aplicação dos revestimentos, foram feitos testes microbiológicos com *S. aureus* (ATCC 25923) seguindo o procedimento descrito na seção 2.3 deste capítulo (BERTOLO *et al.*, 2022; DIAS *et al.*, 2022).

A suspensão de bactérias padronizada (1 mL) foi transferida para uma placa de 24 poços e os morangos revestidos e não revestidos foram adicionados e mantidos na suspensão de bactérias por 10 min. Em seguida, os frutos foram realocados para outra placa de 24 poços e irradiados com luz verde (525 nm, 50 J cm⁻²). Para o ensaio de viabilidade, os morangos foram transferidos para tubos com solução salina estéril (1 mL) e agitados no vórtex, e alíquotas das amostras foram diluídas usando solução salina estéril. Para o cálculo das unidades formadoras de colônias, alíquotas de 16,6 μL (duplicata) foram espalhadas em placas com ágar BHI e incubadas em condições anaeróbicas por 24 h, a 37 °C. Cada amostra foi analisada em duplicata em três ocasiões distintas (n = 6).

2.7 Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi adotado para a análise de parametricidade e o programa ActionStat (Estatcamp, 2014, São Carlos, SP, Brasil) foi utilizado para avaliar a homogeneidade dos dados; dados paramétricos e homogêneos foram analisados quanto à sua significância pela ANOVA seguida pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e dados não paramétricos foram analisados quanto à sua significância pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

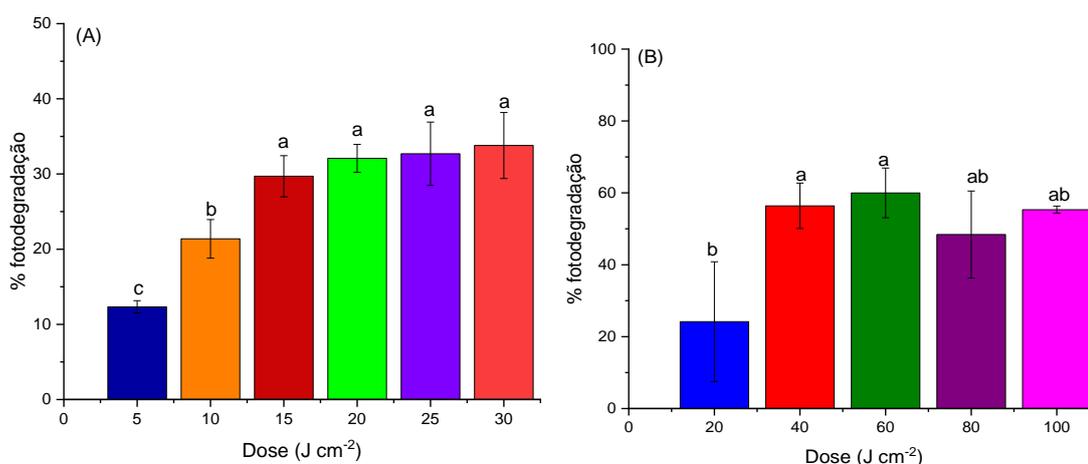
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Fotodegradação do extrato de casca de romã e dos revestimentos

O extrato de casca de romã e o filme QGE foram analisados quanto ao seu perfil de fotodegradação, ou seja, sua estabilidade frente à aplicação de luz. Este teste permite prever o comportamento da absorvância (para o extrato) ou da fluorescência (para o filme QGE) dos materiais sob iluminação e se está ocorrendo fotodegradação. A degradação indica que espécies reativas de oxigênio estão sendo formadas, o que é necessário para o uso desses materiais como filmes antimicrobianos em terapia fotodinâmica (DIAS *et al.*, 2022; DYSART; SINGH; PATTERSON, 2005).

A porcentagem de fotodegradação encontrada para o extrato de casca de romã e para QGE quando submetidos à aplicação de diferentes doses de luz (0 - 100 J cm⁻²) a 525 nm é apresentada nos gráficos de barras da Figura 5.2(A) e 5.2(B), respectivamente. O decaimento da absorvância do extrato levou a um aumento significativo da fotodegradação até 15 J cm⁻², dose na qual a degradação se estabilizou em torno de 30%. O filme QGE também apresentou um decaimento em sua intensidade de fluorescência dependente da dose de luz aplicada, com uma degradação máxima em torno de 60% alcançada com 60 J cm⁻².

Figura 5.2. Fotodegradação induzida pela aplicação de doses cumulativas de luz verde (em 525 nm) para: (A) extrato de casca de romã e (B) filme QGE.



Fonte: autoria própria. Em uma mesma amostra, diferentes letras sobrescritas indicam valores estatisticamente diferentes por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$).

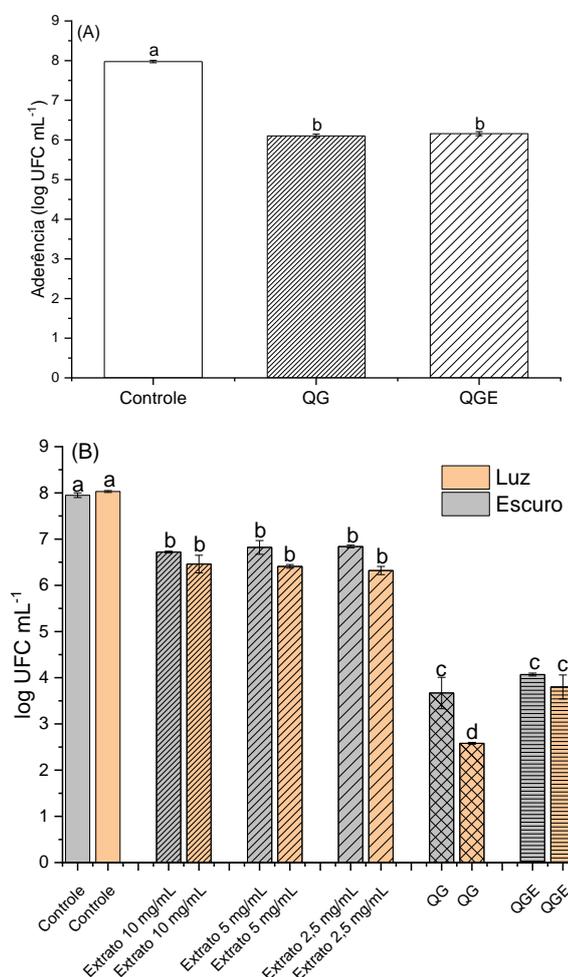
Os resultados de fotodegradação comprovam que tanto o extrato de casca de romã quanto os filmes de quitosana/gelatina contendo o extrato são fotossensibilizadores em potencial, pois sofreram degradação induzida pela aplicação de luz, levando ao aparecimento de ERO. Dias *et al.* (2022) prepararam filmes de quitosana (derivada de α -quitina) e gelatina, com diferentes concentrações de curcumina e de extrato de casca de romã. Os autores reportaram que a fotodegradação dos filmes contendo curcumina foi dependente tanto da dose de luz aplicada quanto da concentração dos fenólicos, atingindo um máximo de 50% com 75 J cm^{-2} . Para os filmes contendo o extrato de casca de romã, por outro lado, a degradação não foi dependente da concentração dos fenólicos, apenas da dose aplicada, atingindo cerca de 60% com 100 J cm^{-2} .

3.2 Foto inativação de *S. aureus* pelo extrato de casca de romã e pelos revestimentos

Como o estudo de fotodegradação mostrou que o extrato de casca de romã e o filme QGE são fotossensibilizadores em potencial, avaliou-se sua capacidade de inativar bactérias na presença e ausência de luz. O extrato de casca de romã foi testado em 3 concentrações diferentes (de $2,5$ a 10 mg mL^{-1}). Além de QGE, o filme QG também foi analisado para fins de comparação. Apesar da ausência de extrato, buscou-se avaliar como a atividade antimicrobiana intrínseca da quitosana se comportaria sob a aplicação de luz.

A Figura 5.3(A) mostra a adesão de *S. aureus* à superfície dos filmes QG e QGE, em relação ao controle. Em ambos os casos, a adesão foi em torno de $6 \text{ log UFC mL}^{-1}$. O grupo controle representa a suspensão de bactérias preparada para a condução dos experimentos. Então, da suspensão de 10^8 células mL^{-1} , apenas 6 logs de bactérias aderiram aos filmes. A Figura 5.3(B) mostra que a sobrevivência das bactérias diminuiu em ambos os filmes, atingindo $3,67 \pm 0,34 \text{ log UFC mL}^{-1}$ para o filme QG e $4,07 \pm 0,03 \text{ log UFC mL}^{-1}$ para QGE, no escuro. Com a aplicação de 50 J cm^{-2} de luz, a sobrevivência diminuiu ainda mais, passando para $2,58 \pm 0,02 \text{ log UFC mL}^{-1}$ para QG, e $3,80 \pm 0,26 \text{ log UFC mL}^{-1}$ para QGE. Assim, ambos os filmes foram capazes de reduzir com sucesso a sobrevivência de *S. aureus*, na ausência e na presença de luz, devido à atividade antimicrobiana intrínseca da quitosana (DIAS *et al.*, 2022).

Figura 5.3. (A) Adesão de *S. aureus*, em log UFC mL⁻¹, na superfície dos filmes QG e QGE, em relação ao controle. Em (B), sobrevivência de *S. aureus* após contato com o extrato de casca de romã (em 3 diferentes concentrações) e com os filmes QG e QGE, com e sem aplicação de luz (em 525 nm, 50 J cm⁻²).



Fonte: autoria própria. Barras hachuradas com diferentes padrões representam as diferentes amostras e/ou concentrações testadas. Diferentes letras sobrescritas indicam valores estatisticamente diferentes por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$).

A interação do extrato de casca de romã com a matriz polimérica provavelmente foi responsável pelos valores de sobrevivência de *S. aureus* serem menores para QG do que para QGE, uma vez que reduziu a capacidade da quitosana em interagir com as células-alvo. Apesar disso, a Figura 5.3(B) mostra que o extrato de casca de romã sozinho, ou seja, não incorporado à matriz polimérica, também foi capaz de reduzir a sobrevivência de *S. aureus* em cerca de 1,5 log UFC mL⁻¹. O aumento de sua concentração, entretanto, não afetou significativamente a sobrevivência das bactérias. O mesmo foi válido para a aplicação de luz, que levou apenas à uma ligeira diminuição dos valores de sobrevivência, para uma mesma concentração de extrato. Portanto, os ensaios de

foto inativação microbiana confirmaram que filmes de quitosana/gelatina e quitosana/gelatina incorporados com extrato de casca de romã podem reduzir a adesão e proliferação de bactérias (*S. aureus*) na presença de luz, pela formação de ERO.

Os materiais preparados por DIAS *et al.* (2022), isto é, filmes de quitosana e gelatina com diferentes concentrações de curcumina e de extrato de casca de romã, também foram capazes de reduzir a sobrevivência de *S. aureus* com a aplicação de 50 J cm⁻² de luz. Os autores reportaram que os filmes contendo curcumina foram mais eficazes na redução microbiana em condições de luz (diminuição em até 4 log UFC mL⁻¹), enquanto os filmes contendo extrato de casca de romã reduziram em cerca de 3,5 log UFC mL⁻¹ a sobrevivência das bactérias.

3.3 Fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos revestimentos

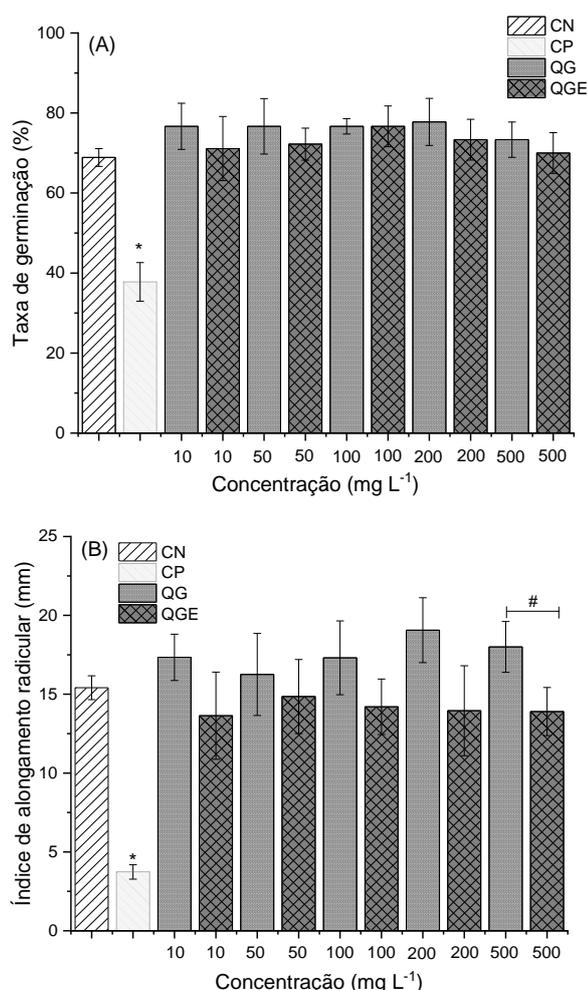
Uma vez que foi demonstrado o potencial dos materiais de revestimento em atuarem como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica, buscou-se avaliar qual seria o impacto de seu uso para o meio ambiente. O modelo de planta *A. cepa* tem sido relatado como uma importante ferramenta para avaliar potenciais indutores de fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade para o meio ambiente (KULOGLU *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2021).

A Figura 5.4(A) mostra a taxa média de germinação (%) das sementes de *A. cepa* em contato com diferentes concentrações das soluções formadoras de filmes QG e QGE, em relação ao controle positivo (herbicida trifluralina) e ao controle negativo (água destilada). As taxas de germinação para as sementes em contato com os materiais ficaram entre 70 e 78%, sem diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) em relação ao tipo de material (QG ou QGE) ou à sua concentração. Também não houve diferença significativa em relação às sementes em contato com o controle negativo (cerca de 69% de germinação). O herbicida, controle positivo, foi o único que levou a uma taxa de germinação significativamente ($p \leq 0,05$) menor, de cerca de 38%.

A Figura 5.4(B) mostra os resultados do alongamento radicular (mm) para as sementes de *A. cepa*, para as mesmas concentrações das soluções QG e QGE. Ambos os materiais apresentaram valores de alongamento de raiz significativamente

iguais ($p > 0,05$) ao do controle negativo (15,41 mm) em todas as concentrações testadas, o que confirma os resultados de taxa de germinação de que os materiais não possuem potencial fitotóxico. A solução formadora de filme QG apresentou uma tendência de valores de alongamento radicular maiores que QGE, mas apenas a concentração de 500 mg L^{-1} apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras. Tal resultado está relacionado a um aumento no processo de divisão celular das sementes quando em contato com QG. O controle positivo apresentou um valor de alongamento radicular (3,73 mm) significativamente ($p \leq 0,05$) menor que as demais amostras, demonstrando que o herbicida TRF teve ação fitotóxica para o organismo testado *A. cepa*.

Figura 5.4. Efeito de diferentes concentrações (10, 50, 100, 200 e 500 mg L^{-1}) de QG e QGE, comparadas a um controle positivo e a um controle negativo, sobre (A) a taxa de germinação das sementes e (B) o alongamento da raiz dos organismos teste *A. cepa*.

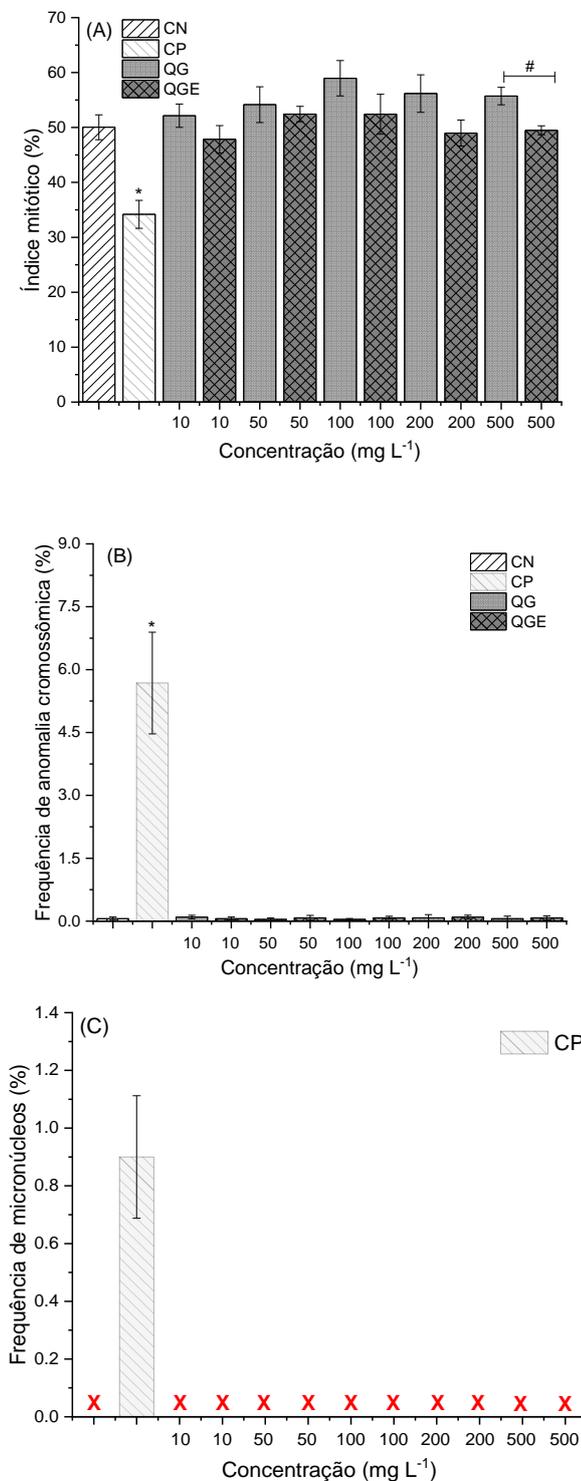


Fonte: autoria própria. *Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre o controle negativo e o positivo, por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$). #Hashtag indica diferenças estatisticamente significativas entre os grupos QG e QGE, para uma mesma concentração, por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$).

O índice mitótico (Figura 5.5(A)) é dado pela razão entre as células divididas e as células observadas. Quando comparadas ao controle negativo, as amostras QG e QGE não apresentaram citotoxicidade para as células meristemáticas de *A. cepa* em quase todas as concentrações testadas. A única exceção foi para a maior concentração, 500 mg L⁻¹, na qual QGE apresentou um baixo potencial de citotoxicidade (índice mitótico significativamente menor que o de QG). Efeitos similares de citotoxicidade induzida pela concentração do material foram reportados por Lima *et al.* (2010), os quais avaliaram a citotoxicidade de diferentes nanopartículas poliméricas à base de quitosana e poli (ácido metacrílico), visando aplicação em embalagens de alimentos. Os autores avaliaram as concentrações de 1,8, 18 e 180 mg L⁻¹ das nanopartículas em células meristemáticas de *A. cepa*, e reportaram reduções do índice mitótico na maior concentração testada para as nanopartículas de maiores diâmetros (82 e 111 nm), indicando citotoxicidade.

Não foram detectadas alterações genotóxicas e mutagênicas significativas nas células em contato com QG e QGE, em nenhuma das concentrações testadas. A análise da frequência de anomalias cromossômicas e frequência de micronúcleos (Figuras 5.5(B) e 5.5(C)) mostrou ausência de micronúcleos para as células em contato com as soluções, bem como pequenos valores de anomalia nuclear (< 0,1%) para elas. O controle positivo, por outro lado, demonstrou potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico para as células meristemáticas de *A. cepa*. Estudos com o herbicida TRF como controle positivo também mostraram inibição da divisão do ciclo celular, formação de anomalia nuclear e micronúcleo (FERNANDES *et al.*, 2007).

Figura 5.5. Efeito de diferentes concentrações (10, 50, 100, 200 e 500 mg L⁻¹) de QG e QGE, comparadas a um controle positivo e a um controle negativo, sobre (A) índice mitótico, (B) frequência de anomalias cromossômicas e (C) frequência de micronúcleos de células meristemáticas dos organismos teste *A. cepa*.



Fonte: autoria própria. *Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre o controle negativo e o positivo, por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$). #Hashtag indica diferenças estatisticamente significativas entre os grupos QG e QGE, para uma mesma concentração, por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$). Em (C), amostras com X em vermelho indicam frequências de micronúcleos menores que 0,1%.

Outros materiais visados para aplicação em alimentos, como poli (ácido láctico) e poli (butileno adipato co-tereftalato), não apresentaram ação fitotóxica, citotóxica, genotóxica ou mutagênica para células meristemáticas de *A. cepa* (PALSIKOWSKI *et al.*, 2018). Estudos com nanoplasticos de poliestireno mostraram uma diminuição significativa na viabilidade celular, uma redução no comprimento da raiz de *A. cepa* e um aumento considerável no estresse oxidativo, todos efeitos dependentes da concentração (12,5 - 50 mg L⁻¹) (GIRI; MUKHERJEE, 2022). Portanto, os resultados deste estudo mostraram que os materiais QG e QGE não apresentaram potencial fitotóxico, citotóxico, genotóxico ou mutagênico no organismo testado *A. cepa* em quase todas as concentrações avaliadas (com exceção da concentração de 500 mg L⁻¹ para QGE), indicando que ambos podem ser aplicados como revestimentos de alimentos sem apresentar risco ao meio ambiente.

3.4 Ensaio *in vivo* com peixe-zebra

Além do potencial indutor de fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos revestimentos QG e QGE, sua ecotoxicidade em ambientes aquáticos também foi determinada, por meio de ensaios *in vivo* com espécies *D. rerio* (peixe-zebra). As soluções de revestimento não apresentaram toxicidade aguda (mortalidade ou anomalias visíveis) contra os animais (machos e fêmeas), em nenhuma das concentrações testadas (até 100 mg L⁻¹), durante as 96 h de exposição.

Xie *et al.* (2022) avaliaram a toxicidade aguda contra o peixe-zebra de micropartículas de dextrano acetalado contendo o fungicida piraclostrobina. A concentração letal das micropartículas foi significativamente menor que a do fungicida não encapsulado, com uma redução de cerca de 40 vezes na toxicidade aguda. Embriões de peixe-zebra também foram usados para avaliar a citotoxicidade de filmes de celulose bacteriana incorporados com curcumina e nanoplaquetas triangulares de prata (GARCIA *et al.*, 2022). Os autores reportaram que apenas as maiores concentrações testadas dos materiais (50%) foram tóxicas, levando a efeitos teratogênicos, como microcefalia e hepatotoxicidade. Assim, os resultados de ecotoxicidade deste estudo indicam que os revestimentos QG e QGE são ambientalmente seguros para organismos aquáticos, uma vez que mesmo em altas concentrações (100 mg L⁻¹) não apresentaram efeitos tóxicos sobre os embriões. É válido ressaltar que, nessa concentração, também não foram observados efeitos de

citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, conforme descrito na seção anterior.

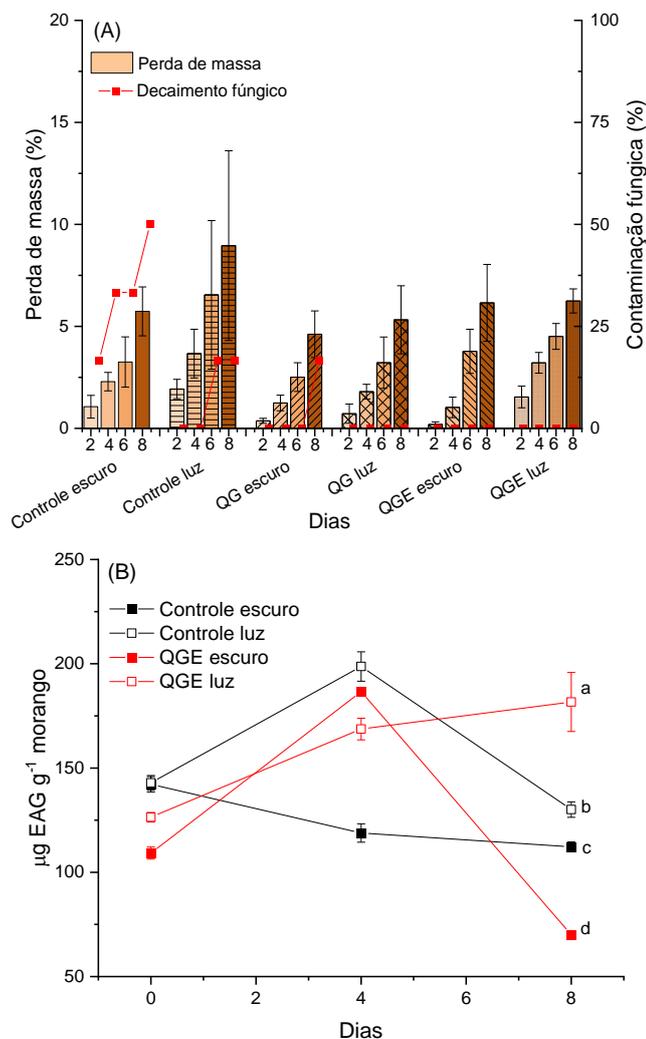
3.5 Avaliação dos morangos

3.5.1 Perda de massa, contaminação fúngica e conteúdo total de fenólicos

Uma vez finalizada toda a caracterização dos materiais de revestimento quanto à sua fotodegradação, foto inativação microbiana, e perfis de toxicidade, deu-se início à avaliação da associação entre os revestimentos aplicados aos morangos e a terapia fotodinâmica. A Figura 5.6(A) mostra a perda de massa e a porcentagem de contaminação fúngica para os morangos revestidos e não revestidos durante os oito dias de armazenamento, após a aplicação da luz verde. A perda de massa aumentou ao longo do tempo para todos os grupos, como esperado, devido à perda de umidade e transpiração dos frutos (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2022a).

Ao final dos oito dias, os valores de perda de massa variaram de $4,61 \pm 1,14$ % (grupo QG, escuro) a $8,96 \pm 4,65$ % (grupo controle, luz). Os grupos revestidos apresentaram porcentagens de perda de massa ligeiramente menores que os frutos do grupo controle, uma vez que os revestimentos atuaram como barreiras contra umidade e transpiração, conforme explicado na seção 3.1 do capítulo 4. Tais resultados indicam que a aplicação de luz e o tempo de exposição dos morangos sem refrigeração não aceleraram sua perda de massa e, conseqüentemente, sua deterioração. De forma semelhante, Tao *et al.* (2018) relataram que a perda de massa de fatias de maçã tratadas com curcumina e terapia fotodinâmica não foi significativamente influenciada pelo tempo de incubação. Além disso, as fatias tratadas com luz apresentaram menores percentuais de perda de massa ao longo do tempo.

Figura 5.6. (A) Perda de massa e contaminação fúngica para os morangos não revestidos e revestidos, durante os oito dias de armazenamento após a aplicação da luz. Os frutos submetidos à aplicação de luz estão incluídos nos grupos “luz” (a 525 nm, 10 J cm⁻²; em ambos os lados), e os não submetidos à aplicação de luz estão incluídos nos grupos “escuros”. (B) Conteúdo total de fenólicos (em µg EAG g⁻¹ morango) para os frutos controle e QGE, dos grupos luz e escuro, durante os oito dias de armazenamento.



Fonte: autoria própria. Barras hachuradas com diferentes padrões representam as diferentes amostras e condições (claro/escuro) testadas. Diferentes letras sobrescritas indicam amostras estatisticamente diferentes por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$), para cada dia de análise.

As porcentagens de contaminação fúngica dos morangos revestidos e não revestidos também são mostradas na Figura 5.6(A). Os frutos do grupo controle escuro foram os primeiros a apresentar contaminação fúngica, e cerca de 17% deles já se encontravam contaminados no quarto dia de armazenamento. Ao final dos oito dias, 50% dos frutos desse grupo estavam totalmente contaminados. A aplicação de luz no grupo controle parece ter retardado a contaminação, pois a presença de

frutos deteriorados neste grupo só foi observada no sexto dia de armazenamento e se estabilizou em 17% até o final dos oito dias.

A combinação de revestimentos poliméricos e aplicação de luz, por outro lado, foi 100% eficaz em retardar a contaminação fúngica para os grupos QG e QGE com luz. Em ambos os grupos, nenhum dos morangos apresentou sinais visíveis de contaminação ao longo do armazenamento. O grupo QG escuro, por sua vez, teve cerca de 17% de seus frutos contaminados no último dia de armazenamento. Tal resultado reflete não só o efeito da aplicação de luz, mas também o efeito dos fenólicos da casca da romã em contribuir para a proteção antimicrobiana, uma vez que os morangos do grupo escuro QGE também não apresentaram contaminação. Mais uma vez, os resultados da associação entre os revestimentos à base de quitosana/gelatina/extrato de casca de romã e a terapia fotodinâmica foram apropriados para a aplicação proposta, tanto por manter a massa dos frutos quanto por retardar sua contaminação.

O conteúdo total de fenólicos dos morangos dos grupos controle e QGE (luz e escuro) também foi avaliado durante o armazenamento (Figura 5.6(B)). Para três dos quatro grupos (com exceção de QGE luz), o teor de fenólicos ao final dos oito dias foi inferior ao inicial. O grupo escuro controle foi o único grupo que não apresentou aumento em seu teor de fenólicos após 4 dias de armazenamento, apenas uma diminuição progressiva. Esse aumento observado nos demais grupos pode estar relacionado ao estresse oxidativo e à própria ação da luz em inibir a enzima polifenol oxidase (a qual diminuiria o teor total de fenólicos devido à oxidação dos mesmos) (SIKORA; SWIECA, 2018).

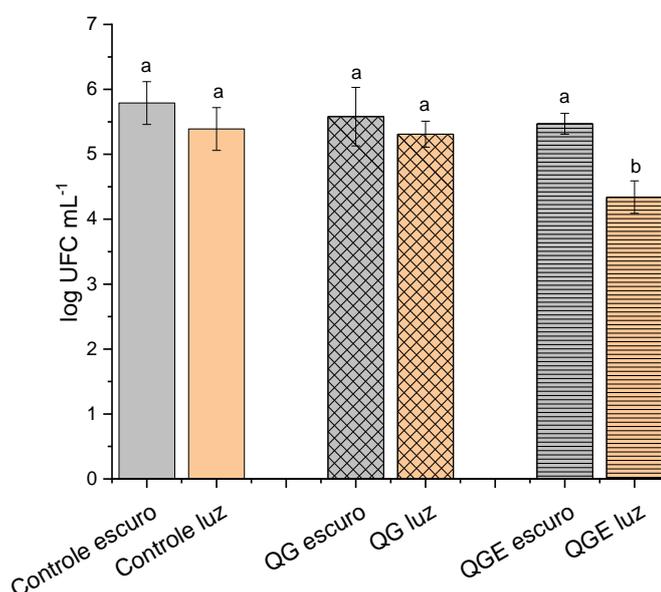
O grupo QGE luz foi o único a não apresentar diminuição de seu conteúdo fenólico ao longo dos dias. Ao contrário, um aumento significativo ($p \leq 0,05$) do quarto para o oitavo dia fez com que os morangos desse grupo apresentassem os maiores conteúdos totais de fenólicos ao final do armazenamento ($181,67 \pm 14,14 \mu\text{g EAG g}^{-1}$). Quando comparado ao grupo QGE escuro, foi evidenciada a ação da luz em retardar a diminuição do conteúdo de fenólicos dos morangos, uma vez que os frutos não submetidos à aplicação de luz tiveram uma redução de $186,58 \pm 1,69 \mu\text{g GAE g}^{-1}$ (quarto dia) para $70,09 \pm 1,49 \mu\text{g GAE g}^{-1}$ (oitavo dia). Juntamente com os resultados de perda de massa e contaminação fúngica, os resultados de conteúdo total de fenólicos mostraram que a qualidade

físico-química dos frutos não foi comprometida (e, na maioria dos casos, foi melhorada) pela associação da luz com os revestimentos poliméricos.

3.5.2 Foto inativação de *S. aureus*

A Figura 5.7 mostra os resultados da foto inativação microbiana feita com os morangos revestidos e não revestidos contra *S. aureus*. Como os filmes já apresentavam resultados de redução da sobrevivência de *S. aureus* sob aplicação de luz (seção 3.2), buscou-se avaliar se os materiais poderiam manter ou melhorar esse efeito quando aplicados nos frutos. Todos os morangos revestidos com QG e QGE apresentaram diminuição na sobrevivência das bactérias quando comparados aos morangos controle escuro ($5,79 \pm 0,33$ log UFC mL⁻¹). Embora não significativa ($p > 0,05$), a aplicação de luz reduziu ainda mais a sobrevivência nos grupos controle luz e QG luz (para $5,39 \pm 0,33$ log UFC mL⁻¹ e $5,31 \pm 0,20$ log UFC mL⁻¹, respectivamente).

Figura 5.7. Sobrevivência de *S. aureus*, em log UFC mL⁻¹, na superfície dos morangos não revestidos e revestidos com QG e QGE, com e sem aplicação de luz (a 525 nm, 50 J cm⁻²).



Fonte: autoria própria. Barras hachuradas com diferentes padrões representam as diferentes amostras e condições (claro/escuro) testadas. Diferentes letras sobrescritas indicam amostras estatisticamente diferentes por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$).

Os morangos do grupo QGE foram os únicos a apresentar uma sobrevivência significativamente menor ($p \leq 0,05$) para *S. aureus* após a aplicação de luz, indo de $5,47 \pm 0,16$ log UFC mL⁻¹ no escuro para $4,34 \pm 0,25$ log UFC mL⁻¹ na luz. Tal efeito é positivo e interessante, já que nos resultados da seção 3.2 o filme QGE não havia

superado o QG em termos de diminuição da sobrevivência das bactérias, devido às fortes interações formadas entre os fenólicos do extrato de casca de romã e as cadeias poliméricas. Porém, uma vez em solução e aplicado nos frutos, a difusão dos fenólicos deve ter sido facilitada. Assim, sua exposição à luz provavelmente formou ERO, e essas espécies foram capazes de contribuir mais para o desempenho antimicrobiano, potencializando a inativação fotodinâmica dos frutos revestidos.

Resultados semelhantes foram relatados por Zhang *et al.* (2020), que compararam os efeitos da terapia fotodinâmica para tomate cereja, morango, uva e cereja, todos revestidos com curcumina, e encontraram percentuais acima de 80% de redução para o conteúdo total de bactérias. Lin *et al.* (2019) também reportaram que a aplicação de luz foi capaz de reduzir o conteúdo total de bactérias para melões minimamente processados.

Assim, a presença do extrato de casca de romã como composto fotossensibilizador neste estudo mostrou que os efeitos da inativação fotodinâmica combinados com os revestimentos à base de quitosana e gelatina foram potencializados, enquanto a qualidade dos frutos foi mantida.

4. CONCLUSÕES

Os resultados deste capítulo abriram novas possibilidades para o uso dos materiais de revestimento desenvolvidos nesta tese de doutorado, combinando-os com a terapia fotodinâmica para a melhoria de sua capacidade de inativação de microrganismos quando aplicados aos morangos. Os filmes de quitosana/gelatina/extrato de casca de romã apresentaram um perfil de fotodegradação dependente da dose de luz aplicada, com degradação máxima em 60 J cm^{-2} , indicativo da formação de ERO. Seu potencial fotossensibilizador foi testado em relação à sobrevivência de *S. aureus*, atingindo uma redução de cerca de $2 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ após a aplicação de luz verde (50 J cm^{-2}). As soluções formadoras dos filmes não apresentaram citotoxicidade, fitotoxicidade ou potencial mutagênico *in vivo*, indicando que podem ser aplicadas como revestimentos em frutas sem apresentar riscos ao meio ambiente. Uma vez aplicados aos morangos, a combinação da aplicação de luz verde e dos revestimentos foi eficaz na manutenção de sua massa, bem como no atraso da contaminação fúngica. Nenhum dos frutos revestidos e expostos à luz apresentou sinais de contaminação visível após oito dias de armazenamento. Os frutos revestidos com QGE apresentaram o maior conteúdo total de fenólicos ao final do armazenamento, mostrando o possível efeito da luz na inibição da ação de enzimas que poderiam degradar os fenólicos dos morangos. Os resultados da foto inativação microbiana nos frutos revelaram uma redução significativa na sobrevivência de *S. aureus* para os morangos revestidos com QGE, possivelmente devido à maior difusão dos fenólicos na rede polimérica quando em solução. Em resumo, essas descobertas fornecem uma nova combinação de ação fotodinâmica com revestimentos poliméricos fotoativos para prolongar a vida útil de morangos, melhorando sua segurança microbiana e não comprometendo sua qualidade.

CAPÍTULO 6

***NOVAS POSSIBILIDADES: ESTRATÉGIAS
VERDES PARA RECUPERAÇÃO DE
COMPOSTOS FENÓLICOS BIOATIVOS DE
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS (CASCAS
DE ROMÃ, CASCAS DE AMÊNDOA E
BAGAÇO DE SABUGUEIRO) USANDO
SOLVENTES EUTÉTICOS NATURAIS
PROFUNDOS***

1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários vegetais e uma das classes mais importantes de compostos bioativos nas plantas (KHEZERLOU; JAFARI, 2020). Eles são encontrados nos vacúolos e nas paredes celulares, livres ou ligados a macromoléculas como celulose, hemicelulose, pectina, e proteínas estruturais (SHAHIDI *et al.*, 2016). Assim, para que esses compostos sejam recuperados, é necessário o emprego de técnicas e solventes de extração que promovam a sua liberação dos tecidos vegetais (WONG; YUSOFF; NGOH, 2023).

Os métodos convencionais de extração de compostos fenólicos, como extração sólido-líquido, maceração e extração por Soxhlet, apresentam como principais desvantagens o longo tempo de extração e o alto consumo de reagentes orgânicos, os quais podem ser tóxicos, prejudiciais à saúde e ao meio ambiente, inflamáveis, corrosivos, de difícil reciclabilidade e descarte, dentro outros (PANDEY; TRIPATHI, 2014; OMEROGLU *et al.*, 2019). Uma das maneiras de se reduzir o tempo de extração e o consumo de reagentes orgânicos é por meio de técnicas de extração mais robustas e com menor consumo de energia, como é o caso da extração assistida por micro-ondas e por ultrassom (WONG; YUSOFF; NGOH, 2023).

Outra forma de se reduzir o consumo de solventes orgânicos convencionais (voláteis, tóxicos e explosivos) é o uso de solventes verdes, como é o caso dos chamados solventes eutéticos profundos (da sigla em inglês, *Deep Eutectic Solvents*, ou DES). Os DES são misturas de dois ou mais componentes em uma composição específica que leva à diminuição do ponto de fusão da mistura final, a qual é líquida à temperatura ambiente (DAI *et al.*, 2013; PAIVA *et al.*, 2014; WONG; YUSOFF; NGOH, 2023). Quando as misturas eutéticas são compostas por metabólitos primários de fontes naturais, como ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares, dentre outros, recebem a denominação de solventes eutéticos naturais profundos (do inglês *Natural Deep Eutectic Solvents*, ou NADES) (PAIVA *et al.*, 2014).

Visando-se a aplicação de compostos fenólicos recuperados de resíduos agroindustriais na conservação de alimentos, o uso dos NADES tem como vantagem o fato destes solventes serem seguros para consumo, biodegradáveis, além de apresentarem alto poder extrativo. Os ganhos econômicos e operacionais, aliados à

sua reciclabilidade e à facilidade de se moldar suas características físico-químicas (como pH, densidade, polaridade e viscosidade), fazem dos NADES substitutos em potencial para solventes orgânicos em processos extrativos (WONG; YUSOFF; NGOH, 2023). Mais ainda, a estabilidade dos compostos fenólicos obtidos com uso de NADES é maior que a dos mesmos com uso de solventes como água (subcrítica ou supercrítica) e etanol, ao longo do tempo (BENVENUTTI; ZIELINSKI; FERREIRA, 2019).

Uma das espécies mais utilizadas na formulação dos NADES é o cloreto de colina, um sal de amônia quaternário que atua como acceptor de ligações de hidrogênio e que pode ser combinado a ácidos orgânicos, açúcares, ureia, dentre outras espécies doadoras de ligações de hidrogênio. O uso de NADES baseados em cloreto de colina, combinado com técnicas assistivas de extração como o ultrassom, pode ter uma influência notável sobre o rendimento da recuperação de compostos fenólicos de matrizes vegetais (ALAÑÓN *et al.*, 2020; MANSINHOS *et al.*, 2021; WONG; YUSOFF; NGOH, 2023).

Outra forma de se aumentar o rendimento de processos extrativos é pelo emprego de ferramentas quimiométricas de otimização, como planejamentos fatoriais fracionários, delineamentos compostos centrais e delineamentos do tipo Box-Behnken. Tais ferramentas visam maximizar a quantidade de fenólicos obtidos durante a extração assistida por ultrassom, ao mesmo tempo em que diminuem o tempo de extração, o consumo de energia e o número de experimentos. O uso de metodologias de superfície de resposta permite que a otimização seja feita com todas as variáveis simultaneamente, e verifica a significância delas, bem como a significância de suas interações, para o processo e para as respostas que precisam ser otimizadas (DAI; MUMPER, 2010; VIEIRA *et al.*, 2018).

Conforme explanado no capítulo 1 desta tese, a romã (*Punica granatum* L.) é conhecida por ser uma planta rica em compostos fenólicos, presentes em grandes quantidades até mesmo nos subprodutos dessa fruta, como a sua casca. O estado da Califórnia é o maior produtor de frutos de romã nos Estados Unidos, sendo responsável por 90% das romãs produzidas no país (BAILEY, 2022). Outros dois subprodutos da indústria alimentícia, considerados ricas fontes de compostos fenólicos e que também possuem importância econômica na Califórnia são a casca de amêndoa e o bagaço de sabugueiro. As amêndoas (*Prunus dulcis*) são a cultura

de exportação mais valiosa da Califórnia, que produz 80% das amêndoas do mundo e representa 100% da oferta comercial dos EUA (California Agriculture Exports, 2019-2020). Os frutos da amendoeira consistem em uma casca externa (*hull*) e uma casca interna rígida (*shell*) que envolvem a amêndoa (*kernel*). As cascas das amêndoas representam em média ~52% do peso fresco total do fruto, mas seu principal destino é a alimentação do gado. Apesar disso, níveis significativos de compostos fenólicos são encontrados na casca da amêndoa, como ácido clorogênico, catequina e quercetina-3-glicosídeo (KAHLAOUI *et al.*, 2019).

Por sua vez, o sabugueiro (*Sambucus nigra* ssp.) foi o suplemento fitoterápico mais vendido nos Estados Unidos em 2020 (SMITH *et al.*, 2020). Em particular, os sabugueiros azuis (*S. nigra* ssp. *cerulea*) são nativos da região oeste da América do Norte e há um interesse especial em usá-los para a produção agrícola comercial. O bagaço de sabugueiro (cascas e sementes) representa 22-29% do peso total dos frutos e é uma rica fonte de compostos fenólicos como cianidina-3,5-diglucosídeo e cianidina-3-sambubiosídeo-5-glicosídeo (antocianidinas), rutina e isoramnetina-glicosídeo (flavonóis), ácido clorogênico, catequina e 5-hidroxi pirogalol hexosídeo (este último encontrado apenas nos frutos do sabugueiro azul) (UHL *et al.*, 2022).

Assim, o objetivo geral deste capítulo foi o de propor o uso de NADES como solventes alternativos para a extração de compostos fenólicos de três resíduos agroindustriais, a casca de romã, a casca de amêndoa e o bagaço de sabugueiro. Em estudos anteriores, a eficiência dos NADES para a otimização da extração assistida por ultrassom dos fenólicos da casca da romã foi comprovada, conforme mostrado no artigo “*Utilization of pomegranate peel waste: natural deep eutectic solvents as a green strategy to recover valuable phenolic compounds*”, publicado no periódico internacional *Journal of Cleaner Production* (fator de impacto = 11,072 em 2023) (BERTOLO *et al.*, 2021a).

Como continuação daquele estudo, os resultados apresentados neste capítulo foram obtidos durante o Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE-FAPESP) conduzido na Universidade da Califórnia – Davis, de outubro/2022 a abril/2023, e publicados no artigo “*Green strategies for recovery of bioactive phenolic compounds from agro-industrial wastes (pomegranate peels, almond hulls, and elderberry pomace) using natural deep eutectic solvents*”, do periódico internacional *ACS Food Science & Technology* (fator de impacto = 2,3 em 2023) (Anexo VI).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

As romãs utilizadas (variedade 'Red Silk', safra 2022) foram adquiridas em um mercado local da cidade de Davis, Califórnia, EUA. Uma vez adquiridos, os frutos foram lavados, higienizados e descascados manualmente. As cascas de amêndoas (*Prunus dulcis*, variedade 'Fritz', safra 2021) foram obtidas da South Valley Farms, na cidade de Wasco, Califórnia, EUA. Os frutos de sabugueiros azuis (*Sambucus nigra* ssp. *cerulea*, safra 2019) foram obtidos da empresa Citrona Farms, na cidade de Winters, Califórnia, EUA (UHL *et al.*, 2022). Todos os materiais foram congelados em N₂ líquido, crio-móidos em um liquidificador de laboratório (Waring Commercial), selados a vácuo em sacos de folhas metálicas (Ultravac Koch) e armazenados ao abrigo da luz a -20 °C. Todos os solventes, padrões e reagentes utilizados nas preparações e caracterizações foram de grau PA ou superior e utilizados como tal.

2.2 Preparo e caracterização dos NADES

Os NADES foram preparados pela mistura do cloreto de colina (CC) com três diferentes ácidos orgânicos: ácido cítrico (CIT), ácido ascórbico (ASC) e ácido láctico (LAT) (a fim de se avaliar a influência da natureza do ácido orgânico sobre as propriedades finais do solvente), conforme descrito por Bertolo *et al.* (2021a). Para a formação de CC-CIT e CC-LAT, ambos os reagentes foram misturados na proporção de 1:1, com adição de 20% (g/g) de água Milli-Q. No caso do CC-ASC, a proporção de 1:1 foi testada com diferentes quantidades de água (20, 40 e 50%), mas todas levaram à recristalização do ácido ascórbico após resfriamento a 25 °C. Então, uma mistura 2:1 com 20% (g/g) de água foi testada e obtida com sucesso (sem recristalização após o resfriamento). Os NADES foram armazenados a 25 °C e caracterizados quanto ao seu pH (com fitas de pH) e sua densidade (pesando-se 100 µL deles em triplicata) (BERTOLO *et al.*, 2021a).

A polaridade do NADES, outra característica importante para seu poder extrativo, foi determinada pelo método de solvatocromismo baseado no corante Vermelho do Nilo (98%, MedChemExpress), conforme modificações do procedimento descrito por Fernandes *et al.* (2021). Resumidamente, uma solução etanólica de 1 mg mL⁻¹ do corante foi diluída 1:200 nos diferentes NADES, e o espectro de varredura das amostras de 200 a 800 nm foi determinado em um

espectrofotômetro UV-1700 (Shimadzu). O ensaio foi feito em triplicata para cada NADES, e o comprimento de onda de absorvância máxima (λ_{max}) de cada amostra foi usado para calcular o parâmetro de polaridade (energia de transição, E_{NR}), de acordo com a Equação (6.1):

$$E_{NR} (kcal mol^{-1}) = \frac{28.591}{\lambda_{max}} \quad \text{Equação (6.1)}$$

2.3 Escolha do melhor NADES para a extração dos fenólicos

Depois de preparados e caracterizados, os NADES a base de cloreto de colina e ácidos orgânicos foram aplicados nas extrações de fenólicos de cascas de romã, cascas de amêndoas e bagaço de sabugueiro, empregando-se banho ultrassônico (CPX2800, Fisherbrand, ThermoFisher Scientific). Para tanto, foram testadas as seguintes condições de extração, escolhidas arbitrariamente: relação NADES/sólido de 20 g/g, temperatura de 40 °C e extração por 40 min. Em seguida, os extratos obtidos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min (Centrifuge 5424 R, Eppendorf) e armazenados a -8 °C, protegidos da luz. Para fins de comparação, as mesmas extrações em banho ultrassônico foram feitas empregando-se uma solução etanólica (60%, v/v) como solvente. Os extratos etanólicos de cada material foram submetidos às mesmas análises conduzidas para os extratos à base de NADES.

Os extratos de casca de romã e casca de amêndoa obtidos foram caracterizados quanto ao seu conteúdo total de fenólicos e sua atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH. Os extratos de sabugueiro, por sua vez, foram caracterizados quanto ao seu teor de antocianinas e sua atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH.

O conteúdo total de fenólicos dos extratos foi determinado de acordo com o procedimento descrito por Fu *et al.* (2021), com pequenas modificações. Foram pipetados 100 μ L das amostras (diluídas em etanol 60% v/v), colocadas para reagir com 500 μ L do reagente de Folin (diluído 10 vezes em água) por 5 min no escuro. Em seguida, a adição de 400 μ L de solução de carbonato de sódio (7,5%, g/g) interrompeu a reação e a absorvância das amostras foi medida em 725 nm após 15 min (espectrofotômetro UV-1700, Shimadzu). Os NADES correspondentes foram usados como branco (sua absorvância foi deduzida da absorvância das amostras) e diluídos o mesmo número de vezes que seus extratos. O ensaio foi feito em triplicata

para cada extrato, sendo o ácido gálico (em etanol 60% v/v) usado como padrão. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de amostra.

Para a determinação da atividade antioxidante dos extratos frente ao radical livre DPPH, os extratos (diluídos em etanol 60% v/v) foram colocados para reagir com uma solução etanólica de DPPH 0,1 mmol L⁻¹, na proporção de 1:2, seguindo o procedimento descrito por Belwal *et al.* (2019). Após 30 min no escuro, sua absorbância foi medida em 517 nm e utilizada para calcular a % de inibição de DPPH, conforme a Equação (2.1) do capítulo 2. Os NADES correspondentes foram usados como branco e diluídos o mesmo número de vezes que seus extratos. Os ensaios foram feitos em triplicata.

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{Abs branco} - \text{Abs final}}{\text{Abs branco}} \times 100 \quad \text{Equação (2.1)}$$

Os extratos de sabugueiro também tiveram seu teor total de antocianinas (TTA) determinado, de acordo com o método de pH diferencial descrito por Lee, Durst e Wrolstad (2005) e conforme procedimento descrito na seção 2.4.2 do capítulo 4. Para isso, os extratos foram diluídos 5 vezes em dois tampões diferentes (pH 1,0 e pH 4,5), e suas absorbâncias foram medidas após 20-30 min em 520 e 700 nm. Água foi utilizada como branco e a concentração de antocianinas foi calculada de acordo com a Equação (4.3). O ensaio foi feito em triplicata para cada extrato, e o TTA foi expresso em µg equivalentes de cianidina-3- glicosídeo g⁻¹.

$$\text{Teor de antocianinas (mg L}^{-1} \text{ de cianidina-3-glicosídeo)} = \frac{(A \times 449,2 \times FD \times 1000)}{(\epsilon \times 1)} \quad \text{Equação (4.3)}$$

2.4 Planejamento experimental para a otimização da extração dos fenólicos

Com base nos resultados dos experimentos descritos na seção 2.2.2, foi escolhido o NADES mais eficiente para a extração dos compostos fenólicos de cascas de romã, cascas de amêndoas e bagaço de sabugueiro. Uma metodologia de superfície de resposta foi empregada para otimizar as condições de extração de cada resíduo agroindustrial. Para isso, um delineamento do tipo Box-Behnken Design (DBB) de três fatores e três níveis foi conduzido para cada um dos resíduos,

com 15 extrações totais, incluindo 3 repetições no ponto central. As variáveis adotadas no DBB foram: (A) temperatura de extração (°C), (B) tempo de extração (min), e (C) relação NADES/sólido (g/g). A Tabela 6.1 mostra o intervalo adotado para cada variável e as condições de cada extração. Os experimentos foram executados aleatoriamente.

Tabela 6.1. Variáveis codificadas e reais (temperatura, tempo e razão NADES/sólido) empregadas no DBB (três níveis e três fatores) para a otimização das condições de extração de compostos fenólicos de cascas de romã, cascas de amêndoas e bagaço de sabugueiro.

N	A	Temperatura (°C)	B	Tempo (min)	C	NADES/sólido (g/g)
1	-1	30	-1	20	0	20
2	+1	50	-1	20	0	20
3	-1	30	+1	60	0	20
4	+1	50	+1	60	0	20
5	-1	30	0	40	-1	10
6	+1	50	0	40	-1	10
7	-1	30	0	40	+1	30
8	+1	50	0	40	+1	30
9	0	40	-1	20	-1	10
10	0	40	+1	60	-1	10
11	0	40	-1	20	+1	30
12	0	40	+1	60	+1	30
13	0	40	0	40	0	20
14	0	40	0	40	0	20
15	0	40	0	40	0	20

Fonte: autoria própria.

Os dados experimentais obtidos no DBB foram analisados com auxílio do *software* Statistica® 13. As respostas utilizadas para os experimentos foram o conteúdo total de fenólicos para os extratos de casca de romã e casca de amêndoas, e o teor total de antocianinas para os extratos de sabugueiro. Uma vez selecionadas as melhores condições de extração, uma triplicata de extrações foi conduzida para cada um dos três resíduos agroindustriais para validação dessas condições. Os melhores resultados das extrações obtidos no DBB foram então comparados com o uso de solução etanólica (60%, v/v) nas mesmas condições de extração.

2.5 Caracterização dos extratos por HPLC-DAD

Todos os extratos de NADES obtidos nas condições de extração otimizadas (e seus correspondentes extratos etanólicos) foram analisados por cromatografia líquida de alta pressão (do inglês *high pressure liquid chromatography*, HPLC) em um sistema Agilent 1200 (Agilent Technologies) dotado de um detector de arranjo de diodos (DAD). Os compostos fenólicos foram separados em uma coluna InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 (4,6 x 150 mm, 2,7 μm) a 35 °C, de acordo com o método de Pinton *et al.* (2022). Resumidamente, a fase móvel A consistiu em 1,5% (v/v) de ácido fosfórico, e a fase móvel B em acetonitrila com 20% (v/v) da fase A. O gradiente utilizado foi: 10-31% B (0-73 min), 31-62% B (73-75 min) e 62-10% B (80-82 min) e a vazão permaneceu em 1,0 mL min⁻¹. Antes da injeção, os extratos foram diluídos na fase móvel A (na proporção de 1:8) e filtrados em filtro de membrana de 0,2 μm . O volume de injeção das amostras foi de 10 μL , e todos os extratos foram injetados em triplicata.

Quatro comprimentos de onda diferentes foram usados para monitorar e comparar o tempo de retenção e os espectros dos compostos investigados: 280 nm (para ácidos hidroxibenzoicos e fenóis simples), 320 nm (para ácidos hidroxicinâmicos), 360 nm (para flavonóis) e 520 nm (para antocianinas). Para quantificação, curvas de calibração externa (5-500 mg L⁻¹) foram preparadas com padrões autênticos de ácido gálico (280 nm), (+)-catequina (280 nm), punicalagina (280 nm), ácido cafeico (320 nm), rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo) (360 nm) e cianidina-3-sambubiosídeo (520 nm). Esses compostos foram quantificados como eles próprios, enquanto o ácido elágico foi quantificado como equivalentes de ácido gálico, os fenóis poliméricos como equivalentes de (+)-catequina e a isoramnetina-3-glicosídeo como equivalentes de rutina. O *software* Agilent® ChemStation para LC 3D Systems foi usado para análise de dados.

2.6 Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi adotado para a análise de parametricidade, e o programa ActionStat (Estatcamp, 2014, São Carlos, SP, Brasil) foi utilizado para avaliar a homogeneidade dos dados; dados paramétricos e homogêneos foram analisados quanto à sua significância pela ANOVA, seguida pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$), e dados não paramétricos foram analisados quanto à sua significância pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Preparo e caracterização dos NADES

Todos os NADES preparados tiveram ácidos orgânicos como espécies doadoras de ligações de hidrogênio, visando comparar sua eficiência na extração de compostos fenólicos de diferentes resíduos agroindustriais. Os NADES CC-CIT e CC-LAT apresentaram-se como líquidos homogêneos e transparentes, sem coloração (Figura 6.1). O CC-ASC apresentou coloração alaranjada, o que pode estar relacionado à oxidação parcial do ácido ascórbico durante o aquecimento para a formação da mistura eutética. Além disso, o CC-ASC também foi o único NADES preparado em uma proporção molar diferente (2:1), uma vez que o ácido ascórbico recristalizou após resfriamento em uma proporção de 1:1 com cloreto de colina, independentemente do teor de água adicionado (de 20 a 50%). Ling *et al.* (2020) também relataram que sua mistura de cloreto de colina/ácido ascórbico 2:1 foi a única sem quaisquer cristais visíveis detectados por microscopia óptica polarizada após o resfriamento. A formação de cristais é uma indicação de que o sistema não é estável e as ligações de hidrogênio formadas não fornecem ordem intermolecular suficiente para a mistura eutética.

Figura 6.1. Da esquerda para a direita: CC-CIT, CC-ASC e CC-LAT.



Fonte: autoria própria.

A Tabela 6.2 mostra os valores de pH e densidade dos três NADES obtidos, bem como da solução etanólica 60% (v/v) adotada como meio de extração comparativo. Devido à natureza das espécies doadoras de ligações de hidrogênio, todos os NADES mostraram-se extremamente ácidos. CC-CIT apresentou valores de pH variando entre 1 e 2, enquanto o pH de CC-LAT e CC-ASC variou de 2 a 3. A solução etanólica, por sua vez, apresentou uma faixa de valores de pH de 6 a 7, maiores que o pH do NADES e mais próximos da neutralidade.

A densidade do NADES variou de $1,12 \pm 0,02 \text{ g mL}^{-1}$ (CC-LAT) a $1,23 \pm 0,07 \text{ g mL}^{-1}$ (CC-CIT), sendo que a solução etanólica apresentou uma densidade significativamente menor ($p \leq 0,05$). Os resultados de pH e de densidade concordam com os reportados por Bertolo *et al.* (2021a), nos quais CC-CIT também foi o NADES mais denso ($\sim 1,63 \text{ g mL}^{-1}$) e com menor pH, enquanto a solução etanólica foi o solvente menos denso ($\sim 1,14 \text{ g mL}^{-1}$) e com maior pH.

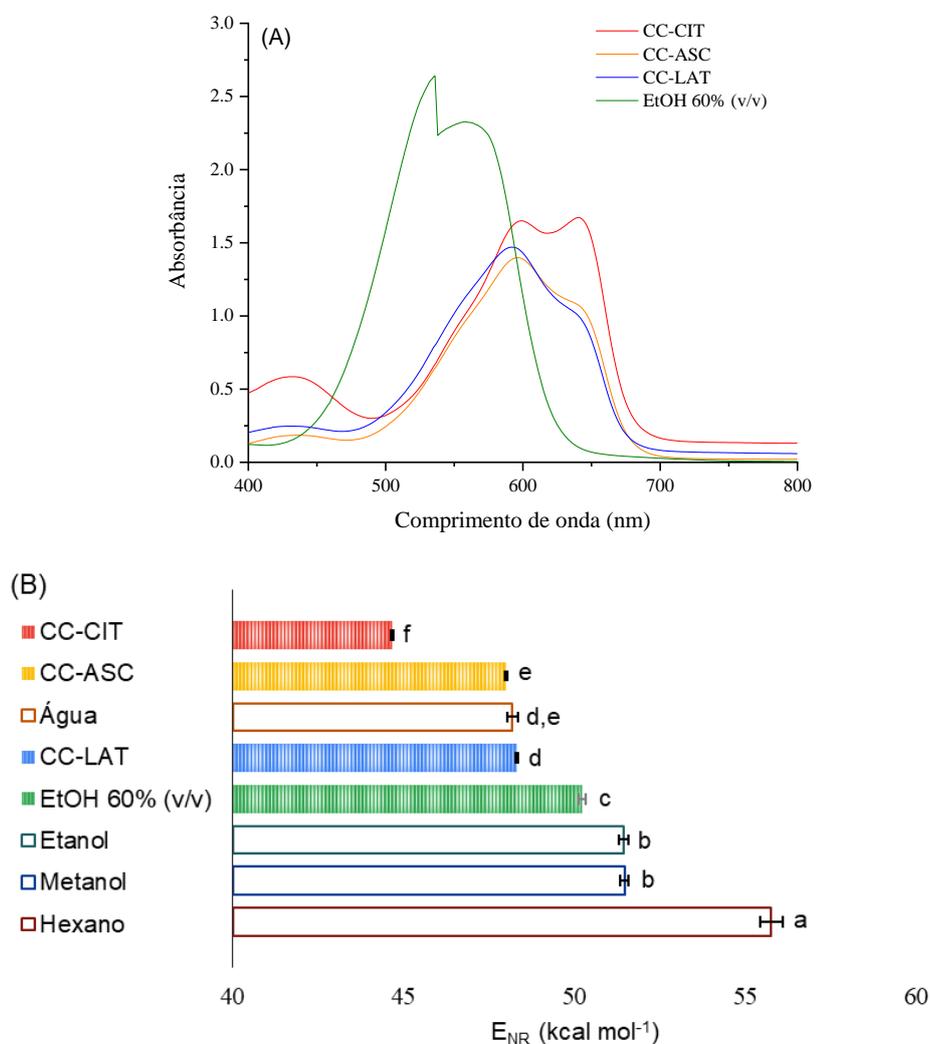
Tabela 6.2. Valores de pH, densidade, comprimento de onda de absorbância máxima (λ_{max}) e valores de energia de transição (E_{NR}) (a 25 °C) de CC-CIT, CC-ASC, CC-LAT, comparados à solução etanólica 60% (v/v).

Solvente	pH	Densidade (g mL^{-1})	λ_{max} (nm)	E_{NR} (kcal mol^{-1})
CC-CIT	1-2	$1,23 \pm 0,07^a$	640	$44,67 \pm 0,02^d$
CC-ASC	2-3	$1,18 \pm 0,04^{ab}$	596	$48,00 \pm 0,04^c$
CC-LAT	2-3	$1,12 \pm 0,02^b$	592	$48,31 \pm 0,04^b$
EtOH 60% (v/v)	6-7	$0,91 \pm 0,01^c$	569	$50,22 \pm 0,11^a$

Fonte: autoria própria. Em uma mesma coluna, valores com letras sobrescritas diferentes indicam amostras estatisticamente diferentes por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$).

A polaridade de um solvente influencia as quantidades, bem como o perfil dos compostos fenólicos extraídos. A polaridade dos NADES foi avaliada e comparada com a da solução etanólica pelo método de solvatocromismo baseado no corante Vermelho do Nilo, que mede os deslocamentos do comprimento de onda de absorbância máxima do corante (λ_{max}) de acordo com o solvente no qual ele é diluído. A Figura 6.2(A) mostra as bandas de absorção solvatocrômica no UV-Vis, de 400 a 800 nm, para os três NADES e para a solução etanólica. A partir dos valores de λ_{max} , o parâmetro de energia de transição (E_{NR}) foi determinado para cada solvente (Tabela 6.2).

Figura 6.2. (A) Espectros UV-vis (400 - 800 nm) obtidos para os diferentes NADES e para a solução etanólica 60% (v/v) após a diluição do corante Vermelho do Nilo. (B) Valores de E_{NR} (em kcal mol⁻¹) para os três NADES preparados neste estudo (CC-CIT, CC-ASC e CC-LAT), a solução etanólica 60% (v/v) usada como meio extrativo de comparação, e quatro solventes convencionais (barras vazias) usados na extração de compostos fenólicos (água, etanol, metanol e hexano).



Fonte: autoria própria. Barras com letras diferentes indicam amostras estatisticamente diferentes por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$).

Os valores de E_{NR} variaram de $44,67 \pm 0,02$ (CC-CIT) a $50,22 \pm 0,11$ (EtOH 60% v/v) kcal mol⁻¹. Quanto maior a energia de transição, menor a polaridade do solvente, o que mostra que todos os três NADES preparados foram mais polares que a solução etanólica, provavelmente devido à presença dos ácidos orgânicos. Além disso, a polaridade está diretamente relacionada à força do ácido orgânico usado como doador de ligação de hidrogênio. Quanto menor o pKa do ácido, maior sua força e maior a polaridade do NADES baseado nele (menor E_{NR}) (JURIĆ *et al.*, 2021). O pKa do ácido cítrico é o menor entre os três ácidos utilizados (3,14), o que

explica a maior polaridade do CC-CIT. O ácido láctico tem um pKa de 3,86, enquanto o pKa do ácido ascórbico é de 4,70, e a tendência presumível seria CC-ASC apresentar uma polaridade menor (maior E_{NR}) do que CC-LAT. No entanto, a proporção molar dos ácidos em relação ao cloreto de colina precisa ser considerada e, neste caso, o CC-ASC (2:1) foi ligeiramente mais polar que o CC-LAT (1:1) ($p \leq 0,05$).

Para fins de comparação, alguns solventes tradicionais utilizados para a extração de fenólicos (água, etanol, metanol e hexano) também foram avaliados quanto à polaridade e organizados por ordem de similaridade junto com os NADES no gráfico da Figura 6.2(B). O CC-CIT foi o mais polar entre todos os solventes avaliados, enquanto CC-LAT, água e CC-ASC apresentaram valores de E_{NR} muito semelhantes (em torno de 48 kcal mol^{-1}). A solução etanólica 60% (v/v) foi mais polar que o etanol isoladamente, que apresentou estatisticamente o mesmo valor de E_{NR} do metanol (aproximadamente $51,4 \text{ kcal mol}^{-1}$). Finalmente, como esperado, o hexano foi o solvente menos polar, com um valor de E_{NR} de $55,75 \pm 0,33 \text{ kcal mol}^{-1}$. Os resultados dos ensaios de polaridade mostram que todos os NADES preparados e caracterizados nesta etapa do estudo podem ser utilizados como substitutos dos solventes orgânicos tradicionais em termos de polaridade.

3.2 Escolha do melhor NADES para a extração dos fenólicos

A Tabela 6.3 mostra o conteúdo total de fenólicos de todos os extratos obtidos com os NADES e a solução etanólica. Para os extratos à base de CC-CIT, os conteúdos variaram de $5,13 \pm 0,56$ (sabugueiro) a $25,46 \pm 0,52 \text{ mg EAG g}^{-1}$ (cascas de romã). No caso do extrato de casca de amêndoa, a quantidade de compostos extraídos foi muito baixa para ser detectada sem a interferência do precipitado de cloreto de colina, quando em contato com o reagente de Folin-Ciocalteu.

A determinação do conteúdo de fenólicos totais dos extratos à base de CC-ASC não foi possível, o que pode estar relacionado à presença do ácido ascórbico nessas amostras. Devido à sua forte capacidade antioxidante, esse ácido reage rapidamente com o reagente de Folin, reduzindo-o e levando a uma superestimação do teor de fenólicos totais da amostra (SÁNCHEZ-RANGEL *et al.*, 2013). Assim, uma vez em contato com o reagente de Folin, o CC-ASC apresentou valores de absorvância superiores aos de seus extratos, tornando-se pouco confiável quantificar seu conteúdo total de fenólicos. Por esta razão, os extratos

Capítulo 6 – Resultados e Discussões

obtidos com CC-ASC não foram mais utilizados, e este NADES não foi considerado para o estudo de otimização da extração.

Tabela 6.3. Conteúdo total de fenólicos, atividade antioxidante contra o radical livre DPPH e teor total de antocianinas para os extratos de casca de romã, casca de amêndoa e bagaço de sabugueiro obtidos com CC-CIT, CC-LAT e a solução etanólica 60% (v/v).

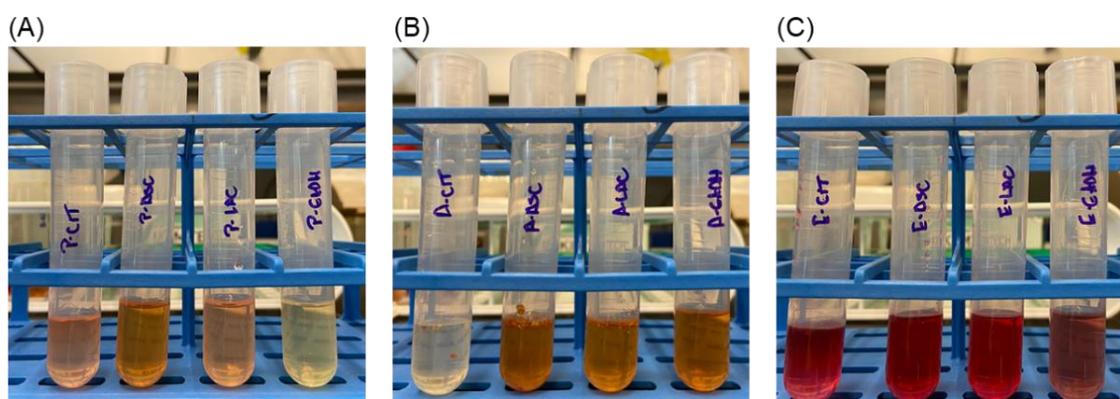
Extrato	Conteúdo total de fenólicos (mg EAG g ⁻¹)	% inibição contra o DPPH*	Teor total de antocianinas (µg cianidina-3-glicosídeo g ⁻¹)
Casca de romã			
CC-CIT	25,46 ± 0,52 ^c	93,52 ± 0,18 ^a	-
CC-LAT	64,23 ± 0,94 ^a	92,65 ± 0,15 ^a	-
EtOH 60% (v/v)	32,55 ± 0,26 ^b	84,84 ± 0,77 ^b	-
Casca de amêndoa			
CC-CIT	N.D.	N.D.	-
CC-LAT	61,66 ± 0,26 ^b	56,56 ± 3,48 ^b	-
EtOH 60% (v/v)	79,12 ± 4,75 ^a	91,93 ± 0,18 ^a	-
Bagaço de sabugueiro			
CC-CIT	5,13 ± 0,56 ^a	68,91 ± 0,15 ^b	523,79 ± 35,71 ^b
CC-LAT	4,48 ± 0,21 ^a	67,12 ± 5,91 ^b	558,30 ± 31,08 ^b
EtOH 60% (v/v)	5,22 ± 0,16 ^a	85,14 ± 2,07 ^a	793,20 ± 45,46 ^a

Fonte: autoria própria. Para um mesmo material, letras sobrescritas diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) por ANOVA e Tukey. -: não avaliado para a amostra; N.D.: não quantificado para a amostra. *Para os valores de % inibição contra o radical DPPH, considerar uma diluição de 200 vezes para os extratos de casca de romã e de casca de amêndoa, e de 10 vezes para os extratos de sabugueiro.

O CC-LAT foi o NADES que forneceu os maiores valores de conteúdo total de fenólicos, tanto para a casca de romã quanto para a casca de amêndoa. Apesar de ter uma polaridade menor que CC-CIT, duas possíveis razões para os melhores resultados de extração de CC-LAT podem ser: 1) ácidos monocarboxílicos, como o

ácido láctico, tendem a levar a maiores rendimentos de extração de fenólicos do que ácidos di e tricarbóxicos (como o ácido cítrico) (VIEIRA *et al.*, 2018); 2) de acordo com resultados prévios, o CC-CIT é cerca de 10 vezes mais viscoso que o CC-LAT (BERTOLO *et al.*, 2021a). Quanto menos viscoso o solvente, maior sua capacidade de solvatação, principalmente para materiais mais densos, como é o caso da casca de amêndoa. A diferença na coloração dos extratos de casca de amêndoa de CC-CIT e CC-LAT mostrada na Figura 6.3(B) também corrobora essa hipótese e possivelmente explica por que CC-CIT não foi capaz de extrair uma quantidade significativa de fenólicos para este material. Em relação aos extratos de sabugueiro (Figura 6.3(C)), por outro lado, ambos os extratos de CC-CIT e CC-LAT apresentaram conteúdos totais de fenólicos baixos e estatisticamente iguais ($p > 0,05$).

Figura 6.3. Extratos de (A) casca de romã, (B) casca de amêndoa e (C) bagaço de sabugueiro obtidos com CC-CIT, CC-ASC, CC-LAT e etanol 60% (v/v) (da esquerda para a direita).



Fonte: autoria própria.

A solução etanólica também extraiu aproximadamente a mesma quantidade de compostos fenólicos dos sabugueiros. Além disso, o extrato etanólico da casca de amêndoa apresentou um teor de fenólicos superior ao encontrado para o mesmo extrato com CC-LAT. Tal resultado é provavelmente devido à menor viscosidade e menor polaridade da solução etanólica, que pode ter extraído uma quantidade maior de compostos menos polares do que aqueles que foram extraídos por CC-LAT. O extrato etanólico da casca da romã (Figura 6.3(A)), por sua vez, apresentou um teor de fenólicos menor que o do extrato de CC-LAT, o que também pode estar relacionado à polaridade dos compostos que estão sendo extraídos das cascas da romã pelo etanol.

Neste caso, dos três NADES estudados e não considerando o CC-ASC devido aos seus valores superestimados de fenólicos totais, o CC-LAT foi o único capaz de extrair quantidades iguais ou superiores de fenólicos quando comparado à solução etanólica para dois dos três resíduos agroindustriais avaliados. A menor viscosidade, polaridade e número de grupos -COOH do CC-LAT quando comparado aos outros NADES, e seu pH mais baixo quando comparado à solução etanólica, possivelmente atuaram em sinergismo para facilitar a extração dos fenólicos (BERTOLO *et al.*, 2021a).

A Tabela 6.3 também apresenta os valores % de inibição contra o radical livre DPPH encontrados para os extratos de casca de romã, casca de amêndoa e bagaço de sabugueiro obtidos com os NADES e a solução etanólica. Para as cascas de romã, ambos os extratos obtidos com os NADES apresentaram valores de inibição significativamente iguais ($p > 0,05$) e próximos de 93% (considerando-se uma diluição de 200 vezes), cerca de 9% maior que o valor obtido para o extrato etanólico. Assim, apesar de ter um conteúdo total de fenólicos maior que o extrato de romã à base de CC-CIT, o extrato etanólico não apresentou maior atividade antioxidante, provavelmente porque os fenólicos extraídos pela solução etanólica são menos polares que os extraídos por CC-CIT e apresentam menor atividade antioxidante contra o radical DPPH.

Em relação aos extratos de casca de amêndoa, os valores de % de inibição variaram de $56,56 \pm 3,48$ (CC-LAT) a $91,93 \pm 0,18\%$ (EtOH 60% v/v), também considerando-se uma diluição de 200 vezes. Para o extrato à base de CC-CIT, a % de inibição não pode ser determinada, devido ao seu baixo conteúdo total de fenólicos. O alto valor de inibição do extrato etanólico pode ser explicado pelo seu maior teor de fenólicos (como mencionado anteriormente) e é comparável com os valores de atividade antioxidante dos extratos de casca de romã obtidos com os NADES.

Os extratos de bagaço de sabugueiro obtidos com os NADES apresentaram valores de % inibição significativamente iguais e em torno de 68%, enquanto o extrato etanólico apresentou uma inibição cerca de 17% maior. Assim, apesar do conteúdo total de fenólicos dos três extratos de sabugueiro ter sido significativamente igual, a natureza dos compostos extraídos pela solução etanólica pode estar influenciando na atividade antioxidante dos extratos. É válido ressaltar,

entretanto, que esses valores de % de inibição foram obtidos com os extratos diluídos apenas 10 vezes, o que indica que seu poder antioxidante é bem menor que o dos extratos de casca de romã e de casca de amêndoa.

Como os extratos de bagaço de sabugueiro apresentaram os menores valores de conteúdo total de fenólicos e atividade antioxidante, e como esses frutos são ricos em antocianinas (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2021), seu teor total de antocianinas também foi determinado (Tabela 6.3). Tanto CC-CIT quanto CC-LAT extraíram a mesma quantidade ($p > 0,05$) de antocianinas dos sabugueiros, menor do que a extraída pela solução etanólica. Esse resultado pode estar relacionado à menor polaridade da solução etanólica quando comparada aos NADES, o que favorece a extração de compostos menos polares, como as antocianinas.

O maior teor de antocianinas do extrato etanólico explica a sua maior % de inibição contra o radical livre DPPH. Duymus *et al.* (2014) compararam diferentes solventes orgânicos para extração de antocianinas de sabugueiro silvestre da Turquia, e o extrato etanólico (70%, v/v) também foi o que apresentou maior quantidade de antocianinas monoméricas totais, com cerca de 1070 mg de cianidina-3- glicosídeo por 100 gramas de extrato.

Uma vez caracterizados todos os extratos, foi escolhido o melhor NADES para o estudo de otimização da extração. Apesar de sua maior polaridade, o CC-CIT foi o solvente com os menores valores de fenólicos totais e atividade antioxidante, tanto para cascas de amêndoas quanto para cascas de romãs, devido à sua maior viscosidade. Por outro lado, quando comparado com a solução etanólica, CC-LAT extraiu mais que o dobro de compostos fenólicos das cascas de romã, extraiu a mesma quantidade de fenólicos e uma quantidade ligeiramente menor de antocianinas dos sabugueiros, e extraiu uma quantidade menor, mas ainda alta, de fenólicos de cascas de amêndoa. Portanto, o CC-LAT foi escolhido como o NADES mais adequado para ser aplicado no estudo de otimização da extração dos fenólicos dos três materiais em estudo.

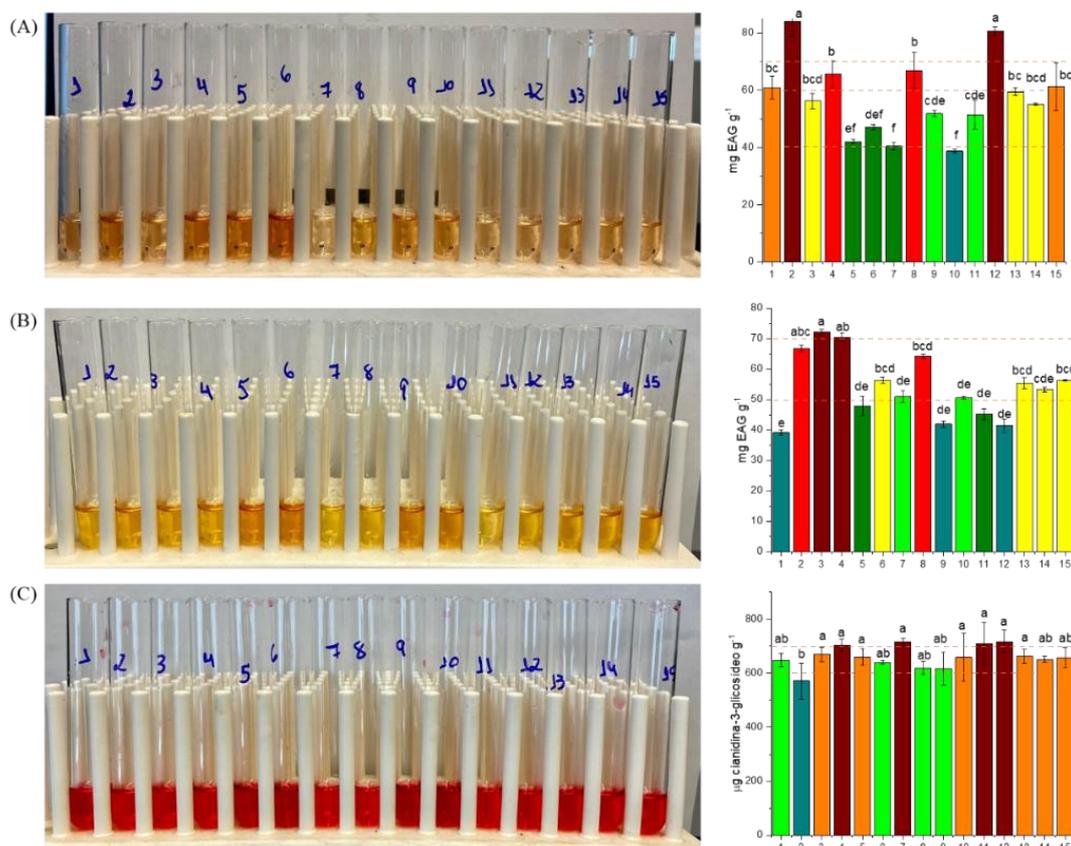
3.3 Planejamento experimental para a otimização da extração dos fenólicos

As extrações de fenólicos das cascas de romã, cascas de amêndoa e bagaço de sabugueiro foram otimizadas em relação a três condições experimentais importantes: temperatura de extração, tempo de extração e relação NADES/sólido. O delineamento Box-Behnken conduzido resultou em 15 extratos para cada um dos três materiais, e seus conteúdos totais de fenólicos (no caso dos extratos de casca de romã e casca de amêndoa) e teores totais de antocianinas (no caso dos extratos de sabugueiro) são mostrados nos gráficos de barras da Figura 6.4.

Para os extratos de casca de romã (Figura 6.4(A)), os valores de conteúdo de fenólicos variaram de $40,46 \pm 1,26$ (extrato obtido no experimento 7) a $84,00 \pm 5,36$ (extrato obtido no experimento 2) mg EAG g⁻¹. As amostras com um teor superior a 80 mg EAG g⁻¹ foram as extrações dos experimentos 2 e 12. Os extratos de casca de amêndoa (Figura 6.4(B)), por sua vez, tiveram seu teor de fenólicos variando de $39,22 \pm 0,77$ (extrato 1) a $72,17 \pm 0,94$ (extrato 3) mg EAG g⁻¹. As amostras com um teor superior a 70 mg EAG g⁻¹ foram as extrações obtidas com os experimentos 3 e 4, aquelas com os maiores tempos de extração (60 min) e com relação NADES/sólido no nível central (20 g/g).

Para os extratos de sabugueiro (Figura 6.4(C)), o teor total de antocianinas (TTA) foi a resposta escolhida para otimizar a extração. Os valores de TTA variaram de $571,10 \pm 66,61$ (extrato obtido no experimento 2) a $716,45 \pm 42,59$ (extrato obtido no experimento 12) µg equivalentes de cianidina-3- glicosídeo g⁻¹. As amostras com TTA superior a 700 µg equivalentes de cianidina-3- glicosídeo g⁻¹ foram as extrações dos experimentos 4, 7, 11 e 12. Com exceção do extrato obtido no experimento 4, todos os outros extratos com os maiores valores de TTA foram obtidos nas condições de maior relação NADES/sólido (30 g/g).

Figura 6.4. Extratos de (A) casca de romã, (B) casca de amêndoa e (C) bagaço de sabugueiro obtidos com o delineamento Box-Behnken, usando CC-LAT como NADES, e seus respectivos conteúdos de fenólicos totais (em mg EAG g⁻¹, para os extratos de casca de romã e de casca de amêndoa) e antocianinas totais (em µg cianidina-3-glicosídeo g⁻¹, para os extratos de sabugueiro).



Fonte: autoria própria. Para um mesmo material, amostras com letras sobrescritas diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) por ANOVA e Tukey.

A análise dos resultados de conteúdo total de fenólicos e teor total de antocianinas dos extratos de casca de romã, casca de amêndoa e bagaço de sabugueiro pelo *software* Statistica® 13 levou aos seguintes modelos matemáticos, que descrevem as superfícies de resposta para os planejamentos em função das três variáveis ((A) temperatura, (B) tempo e (C) razão NADES/sólido) (Equações (6.2), (6.3) e (6.4)):

$$\begin{aligned} \text{Conteúdo total de fenólicos (mg EAG g}^{-1} \text{ casca de romã)} &= 57,14 + 15,98A - 7,28B^2 + \\ &14,91C + 10,24C^2 + 21,15BC \quad \text{Equação (6.2)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Conteúdo total de fenólicos (mg EAG g}^{-1} \text{ casca de amêndoa)} &= 53,98 + 11,93A - 8,62A^2 \\ &+ 10,38B + 8,74C^2 - 14,66AB \quad \text{Equação (6.3)} \end{aligned}$$

$$\text{Teor total de antocianinas } (\mu\text{g cianidina-3-glicosídeo g}^{-1} \text{ bagaço de sabugueiro}) = 660,42 - 38,75A + 50,71B + 46,83C - 14,43C^2 + 55,36AB - 38,83AC \text{ Equação (6.4)}$$

A Tabela 6.4 mostra os resultados de ANOVA para os modelos polinomiais acima. Os coeficientes de determinação (R^2) dos modelos dos extratos de casca de romã e casca de amêndoa foram 0,88646 e 0,89149, respectivamente, o que significa que as Equações (6.2) e (6.3) explicam cerca de 89% da variabilidade dos dados para o teor de fenólicos totais desses extratos. Para o extrato de bagaço de sabugueiro, o R^2 do modelo foi 0,83621, o que significa que a Equação (6.4) explica cerca de 84% da variabilidade dos dados para as antocianinas totais.

O modelo matemático obtido para o extrato de casca de romã foi o único que não apresentou falta de ajuste significativa, pois seu F_{cal} da falta de ajuste/erro puro foi menor que seu F_{tab} (Tabela 6.4). Para os modelos matemáticos dos extratos de casca de amêndoa e bagaço de sabugueiro, no entanto, os valores F_{cal} da falta de ajuste/erro puro foram ligeiramente maiores do que F_{tab} , indicando falta de ajuste significativa. Apesar disso, seus valores de R^2 permitem que esses modelos sejam usados para determinar o conteúdo total de fenólicos e o teor de antocianinas totais dos extratos de casca de amêndoa e bagaço de sabugueiro dentro das condições testadas, sem fazer previsões e/ou extrapolações (BOGUSZ *et al.*, 2011).

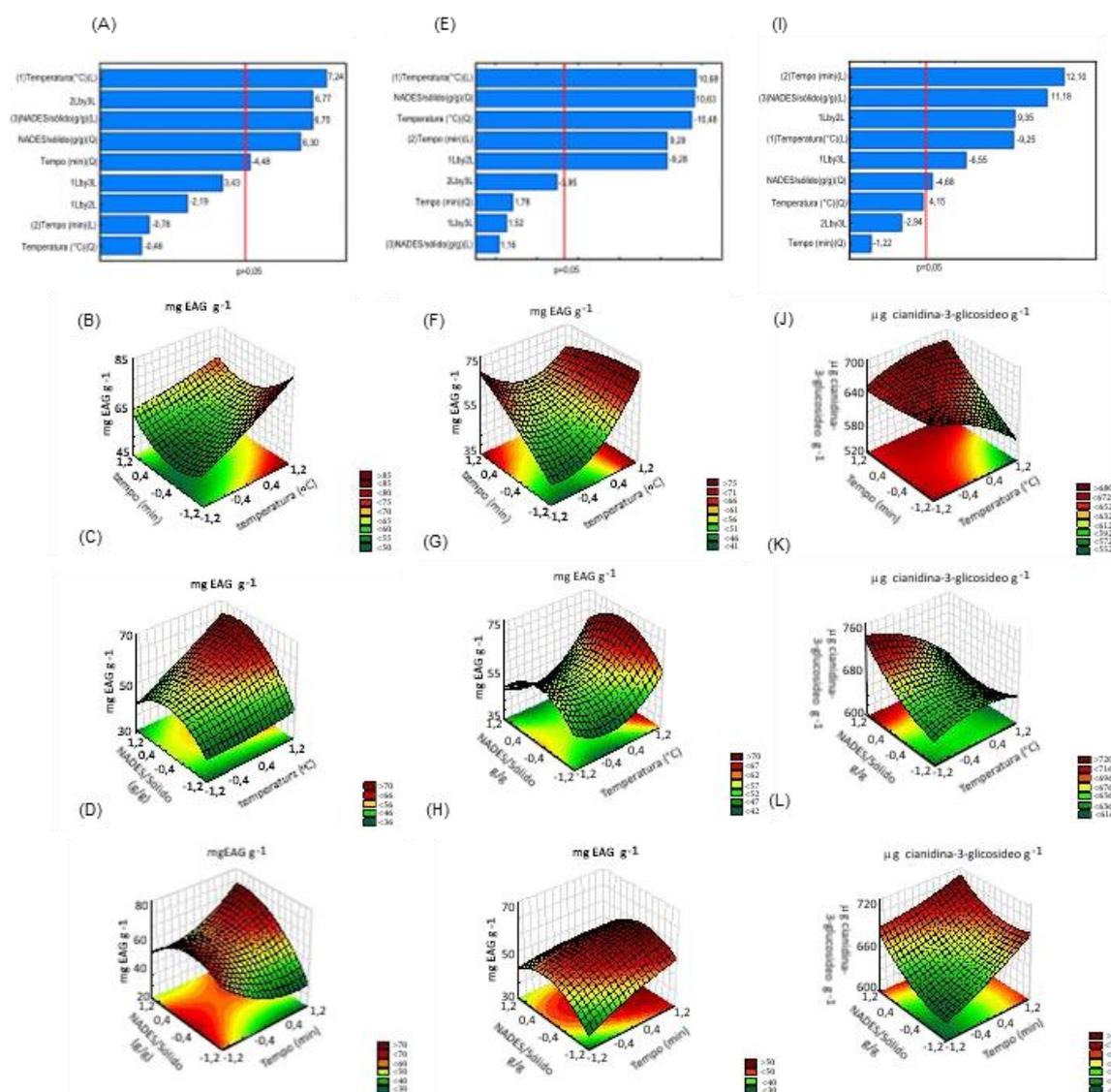
Tabela 6.4. Resultados da ANOVA para o delineamento Box-Behnken conduzido para otimizar as extrações das cascas de romã, cascas de amêndoa e bagaço de sabugueiro com o CC-LAT.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Médias quadráticas	F _{cal}	F _{tab}	F _{cal} /F _{tab}
Conteúdo total de fenólicos – cascas de romã						
Regressão	2,20E+03	9	2,45E+02	4,34	4,77	0,91
Resíduo	2,82E+02	5	5,64E+01			
Falta de ajuste	2,63E+02	3	8,76E+01	8,97	19,16	0,47
Erro puro	1,95E+01	2	9,76E+00			
Total	2,49E+03	14				
R ²	0,88646					
Conteúdo total de fenólicos – cascas de amêndoa						
Regressão	1,37E+03	9	1,53E+02	4,56	4,77	0,96
Resíduo	1,67E+02	5	3,34E+01			
Falta de ajuste	1,62E+02	3	5,41E+01	21,67	19,16	1,13
Erro puro	4,99E+00	2	2,49E+00			
Total	1,54E+03	14				
R ²	0,89149					
Teor total de antocianinas - sabugueiros						
Regressão	1,89E+04	9	2,10E+03	2,84	4,77	0,59
Resíduo	3,71E+03	5	7,42E+02			
Falta de ajuste	3,64E+03	3	1,21E+03	34,57	19,16	1,8
Erro puro	7,02E+01	2	3,51E+01			
Total	2,27E+04	14				
R ²	0,83621					

Fonte: autoria própria.

Por sua vez, os diagramas de Pareto da Figura 6.5 mostram os efeitos significativos de cada variável investigada no planejamento experimental. Para a extração dos fenólicos da casca de romã, a temperatura (+7,23) e a razão NADES/sólido (+6,75) tiveram efeitos lineares (L) significativos. Os efeitos quadráticos (Q) da razão NADES/sólidos (+6,30) e tempo (- 4,48) também foram significativos, assim como o efeito interativo entre essas variáveis (BC) (+6,76) (Figura 6.5(A)). A temperatura também desempenhou um papel importante na extração dos fenólicos da casca da amêndoa, com efeitos lineares (+10,68) e quadráticos (-10,48) significativos (Figura 6.5(E)).

Figura 6.5. Diagramas de Pareto obtidos a partir dos resultados do delineamento Box-Behnken para as extrações de casca de romã (A), casca de amêndoa (E) e bagaço de sabugueiro (I), respectivamente; gráficos de superfície de resposta para temperatura *versus* tempo (razão NADES/sólido = 20 g/g), temperatura *versus* razão NADES/sólido (tempo = 40 min) e tempo *versus* razão NADES/sólido (temperatura = 40 °C), para: (B-D) casca de romã, (F-H) casca de amêndoa e (J-L) bagaço de sabugueiro, respectivamente.



Fonte: autoria própria.

Ainda para as cascas de amêndoa, o tempo também apresentou um efeito linear alto e positivo (+9,19), além de um efeito interativo com a temperatura (AB) (-9,28). O efeito quadrático da razão NADES/sólidos (+10,63) também foi alto e significativo. De maneira geral, todos os efeitos significativos para a extração da casca da amêndoa foram superiores aos observados para a extração da casca da

romã, sendo a temperatura a variável mais significativa em comum entre os dois modelos, com influência positiva.

Para a extração das antocianinas dos sabugueiros (Figura 6.5(I)), todas as variáveis investigadas tiveram efeitos lineares significativos, mas o efeito linear da temperatura foi negativo (-9,25), diferente dos outros dois modelos. O tempo foi a variável com maior influência no teor total de antocianinas, com efeito positivo de +12,10, seguido da razão NADES/sólidos, com efeito positivo de +11,18. A relação NADES/sólidos também teve um efeito quadrático significativo no TTA (-14,43), assim como os efeitos interativos entre temperatura e tempo (AB) (+55,36) e relação NADES/sólidos (AC) (-38,83).

A influência das variáveis para cada uma das extrações também pode ser observada nos gráficos de superfície de resposta da Figura 6.5. Para as cascas de romã (Figuras 6.5(B-D)), os maiores teores de fenólicos (regiões vermelhas das superfícies) foram encontrados em temperaturas de extração mais altas e em maiores razões NADES/sólido, o que concorda com os resultados dos gráficos de barras e do diagrama de Pareto. Para as cascas de amêndoa (Figuras 6.5(E-G)), as regiões vermelhas dos gráficos de superfície podem ser encontradas em tempos de extração mais altos e razões médias NADES/sólido, independentemente da temperatura de extração utilizada, enquanto para as amostras de sabugueiro (Figuras 6.5(H-J)) os valores de TTA mais elevados foram alcançados em tempos de extração e razões NADES/sólido mais altas, mas em temperaturas de extração mais baixas e/ou moderadas.

Além disso, é preciso considerar que, durante uma extração assistida por ultrassom, o material é exposto à sonicação, o que resulta na ruptura celular e na liberação de componentes intracelulares, incluindo fenólicos e antocianinas (FU *et al.*, 2021). No entanto, a sonicação prolongada também pode prejudicar esses compostos, devido às altas temperaturas geradas durante o processo (ISMAIL *et al.*, 2019).

Os resultados do estudo de otimização revelaram que as condições de extração podem ser moldadas de acordo com o material a ser extraído, podendo não ser as mesmas para diferentes matrizes vegetais. Enquanto a temperatura exibiu influência positiva para a extração de fenólicos das cascas de romã, por exemplo, ela não favoreceu a extração de antocianinas do bagaço de sabugueiro.

Extrações mais longas, por outro lado, foram negativas para a extração de fenólicos das cascas de romã, mas favoreceram a extração de fenólicos de cascas de amêndoa e bagaço de sabugueiro. As razões NADES/sólido mais altas foram positivas para todos os materiais, devido à maior área de contato para a dissolução dos componentes intracelulares das células vegetais, em quantidades elevadas de CC-LAT (FU *et al.*, 2021).

As melhores condições para a extração de compostos fenólicos da casca de romã foram as adotadas no experimento 2 (o de maior conteúdo total de fenólicos): temperatura de extração de 50 °C (+1), tempo de extração de 20 min (-1) e relação NADES/sólido de 20 g/g (0). Com relação à casca de amêndoa, as melhores condições foram as obtidas com o experimento 3: temperatura de extração de 30 °C (-1), tempo de extração de 60 min (+1) e relação NADES/sólido de 20 g/g (0). Por fim, as melhores condições para extração de antocianinas do bagaço de sabugueiro foram as obtidas com o experimento 12: temperatura de extração de 40 °C (0), tempo de extração de 60 min (+1) e relação NADES/sólido de 30 g/g (+1).

Para validar esses resultados, uma triplicata de extrações para cada um dos materiais vegetais foi feita nas melhores condições de extração obtidas com o DBB. Após estas extrações, os extratos obtidos tiveram seu conteúdo de compostos fenólicos totais e teor de antocianinas totais determinados. Para a casca de romã, o extrato otimizado apresentou teor de fenólicos de $69,48 \pm 3,08$ mg EAG g⁻¹, superior ao do extrato etanólico obtido nas mesmas condições ($15,62 \pm 2,24$ mg EAG g⁻¹). O valor experimental obtido para o extrato de casca de amêndoa otimizado foi de $75,91 \pm 5,67$ mg EAG g⁻¹, e o do extrato etanólico obtido nas mesmas condições também foi menor para este material ($54,31 \pm 6,80$ mg EAG g⁻¹).

O extrato otimizado de bagaço de sabugueiro apresentou um TTA de $629,05 \pm 32,69$ µg equivalentes de cianidina-3-glicosídeo g⁻¹, e o do extrato etanólico foi de $787,71 \pm 49,85$ µg equivalentes de cianidina-3-glicosídeo g⁻¹. Tal resultado já era esperado devido à menor polaridade da solução etanólica quando comparada ao CC-LAT, o que leva a maiores rendimentos de extração de compostos menos polares, conforme explicado na seção anterior. Os resultados do estudo de otimização das extrações demonstraram que a extração de compostos fenólicos e antocianinas de resíduos de romã, amêndoa e sabugueiro usando CC-LAT pode ser otimizada com precisão durante a extração assistida por ultrassom.

3.4 Caracterização dos extratos por HPLC-DAD

A Tabela 6.5 apresenta as curvas de calibração dos padrões fenólicos com suas respectivas equações lineares, limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ, respectivamente) e coeficientes de correlação (R^2). Os cromatogramas obtidos para os extratos otimizados de casca de romã, casca de amêndoa e bagaço de sabugueiro encontram-se na Figura A9 nos apêndices desta tese. Os fenólicos identificados e quantificados em cada extrato são apresentados na Tabela 6.6, juntamente com seus respectivos tempos de retenção (min).

Tabela 6.5. Curvas de calibração dos padrões fenólicos analisados por HPLC-DAD, com suas respectivas equações lineares, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e coeficientes de correlação (R^2).

Padrão	Equação linear	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	R ²
(+)-catequina	$y = 4,5631x + 36,648$	0,38	1,25	0,9978
Ácido gálico	$y = 17,658x - 1,457$	0,53	1,76	0,9998
Punicalagina	$y = 2,883x - 7,0609$	2,69	8,96	0,9994
Ácido cafeico	$y = 19,79x + 1,1325$	0,02	0,06	0,9999
Rutina	$y = 8,9169x + 19,479$	0,02	0,06	0,9988
Cianidina-3-sambubiosídeo	$y = 16,712x - 24,847$	3,14	10,45	0,9998

Fonte: autoria própria.

Tabela 6.6. Concentrações (em $\mu\text{g g}^{-1}$) dos compostos fenólicos nos extratos otimizados de casca de romã, casca de amêndoa e bagaço de sabugueiro, determinadas por HPLC-DAD.

Composto fenólico	Tempo de retenção (min)	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
		CC-LAT	EtOH 60% (v/v)
Casca de romã			
Ácido gálico	2,43	307,83 \pm 75,13	-
Punicalagina	3,97	108980 \pm 4449 ^a	14124 \pm 1194 ^b
Ácido elágico	24,67	364,63 \pm 47,15 ^a	107,23 \pm 1,07 ^b
Casca de amêndoa			
Ácido gálico	2,70	110,72 \pm 6,72	-
(+)-catequina	7,00	4390 \pm 361 ^a	3193 \pm 827 ^a
Ácido cafeico	9,16	166,64 \pm 15,71	-
Fenóis poliméricos	76,18	364,79 \pm 74,55 ^a	90,15 \pm 7,01 ^b
Bagaço de sabugueiro			
Ácido gálico	2,12	474,12 \pm 20,84	-
(+)-catequina	6,69	510,89 \pm 22,47 ^a	449,05 \pm 26,62 ^a
Cianidina-3-sambubiosídeo	10,72	761,10 \pm 19,92 ^a	246,03 \pm 9,02 ^b
Rutina	26,74	270,17 \pm 7,10 ^a	224,41 \pm 10,56 ^a
Isoramnetina-3-glicosídeo	36,25	182,45 \pm 3,32 ^a	151,01 \pm 5,68 ^a

Fonte: autoria própria. Para um material, amostras com letras sobrescritas diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) por ANOVA e Tukey. -: não avaliado para a amostra.

Para o extrato de casca de romã otimizado, três compostos fenólicos foram identificados e quantificados: ácido gálico, punicalagina e ácido elágico (quantificados como equivalentes de ácido gálico). A punicalagina, um elagitanino que representa cerca de 70% do total de elagitaninos da casca da romã (LIU *et al.*, 2022), foi o composto majoritário presente neste extrato. No caso do extrato etanólico otimizado da casca da romã, apenas punicalagina e ácido elágico puderam ser quantificados e a concentração de punicalagina diminuiu significativamente ($p \leq 0,05$) em comparação ao extrato obtido com o NADES. Este resultado está de acordo com os resultados de conteúdo total de fenólicos do estudo de otimização, que mostrou que o extrato à base de CC-LAT tinha um conteúdo fenólico maior do que o extrato obtido com a solução etanólica, nas condições otimizadas.

A mesma tendência pode ser observada para os extratos de casca de amêndoa otimizados. Quatro compostos fenólicos foram quantificados para o extrato à base de CC-LAT (ácido gálico, (+)-catequina, ácido cafeico e fenóis poliméricos,

quantificados como equivalentes de (+)-catequina), mas o ácido gálico e o ácido cafeico não puderam ser quantificados no cromatograma do extrato etanólico. A (+)-catequina, um flavan-3-ol que contribui principalmente para a alta capacidade antioxidante dos extratos de amêndoas (KAHLAOU *et al.*, 2019), foi o composto majoritário quantificado e sua concentração também diminuiu significativamente ($p \leq 0,05$) no extrato etanólico.

Os extratos de sabugueiro foram os extratos com mais compostos identificados e quantificados. Ácido gálico, (+)-catequina, cianidina-3-sambubiosídeo, rutina e isoramnetina-3-glicosídeo (quantificada como equivalentes de rutina) foram quantificados no extrato à base de CC-LAT, e apenas o ácido gálico não pôde ser quantificado no extrato etanólico. A cianidina-3-sambubiosídeo é responsável por até metade de todo o conteúdo de antocianinas dos extratos de sabugueiro, seguida pela cianidina-3-glicosídeo (VEBERIC *et al.*, 2009). A cianidina-3-sambubiosídeo foi a antocianina e o composto fenólico presente em maior concentração nos extratos otimizados. É válido ressaltar que, apesar do menor TTA encontrado para o extrato à base de CC-LAT no estudo de otimização, a cianidina-3-sambubiosídeo foi extraída em maior quantidade pelo CC-LAT do que pela solução etanólica.

4. CONCLUSÕES

Neste capítulo, o uso de NADES foi apresentado como uma alternativa potencial, nova e mais alinhada com os princípios da química analítica verde para a recuperação de fenólicos de três resíduos agroindustriais: casca de romã, casca de amêndoa e bagaço de sabugueiro. Diferentes NADES à base de cloreto de colina e ácidos orgânicos foram preparados, caracterizados e aplicados nas extrações. O CC-LAT foi o NADES com melhores resultados de conteúdos totais de fenólicos, quando comparado à solução etanólica 60% (v/v). As condições de extrações foram otimizadas com um delineamento do tipo Box-Behnken, e foram diferentes de acordo com o material vegetal investigado, sendo: 50 °C, 20 min e relação NADES/sólido de 20 g/g para casca de romã, 30 °C, 60 min e 20 g/g para casca de amêndoa e 40 °C, 60 min e 30 g/g NADES/sólido para bagaço de sabugueiro. Os compostos majoritários de cada um dos materiais (punicalagina, (+)-catequina e cianidina-3-sambubiosídeo, para cascas de romã, cascas de amêndoas e bagaço de sabugueiro, respectivamente) foram encontrados em maiores concentrações nos extratos à base de CC-LAT do que nos extratos etanólicos obtidos nas condições ótimas de extração, demonstrando o sucesso da aplicação dos NADES em sua recuperação.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Esta tese descreveu o preparo, a otimização e a caracterização de revestimentos naturais à base de quitosana, gelatina e extrato de casca de romã, e sua aplicação para a melhoria da qualidade físico-química, microbiológica e sensorial de morangos.

A composição do revestimento desenvolvido, QGE, foi de 0,8% de quitosana, 0,2% de gelatina e 1 mg g⁻¹ de extrato de casca de romã. O extrato diminuiu a solubilidade dos filmes, aumentou sua hidrofiliabilidade e melhorou suas propriedades mecânicas e de barreira à luz, todas estas características importantes para a aplicação proposta dos materiais de revestimento. O extrato também conferiu propriedade antioxidante aos revestimentos, o que pode atuar em conjunto com a atividade antimicrobiana intrínseca da quitosana na melhoria do controle de patógenos alimentares.

A aplicação do revestimento QGE nos morangos protegeu os frutos contra a desidratação e o ataque de microrganismos, manteve sua coloração e sua firmeza, e retardou as quedas nas suas taxas respiratórias. O revestimento também retardou o desenvolvimento de injúrias causadas por fungos nos frutos, confirmando o que havia sido previsto com os resultados de atividade antimicrobiana conduzidos com o material. Testes sensoriais não apontaram diferenças significativas entre os morangos revestidos e os não revestidos e uma estimativa de custo dos revestimentos para os morangos apontou para um aumento de apenas R\$ 0,13/fruto, o que são resultados de suma importância para que os frutos revestidos sejam aceitos e adquiridos pelos consumidores.

Esta tese também trouxe duas novas possibilidades de áreas de estudo envolvendo revestimentos poliméricos contendo compostos fenólicos. A primeira delas foi o uso de terapia fotodinâmica aliado aos revestimentos, e seus efeitos sobre a qualidade dos morangos revestidos. O revestimento QGE revelou-se um fotossensibilizador em potencial, devido à formação de ERO quando na presença de luz. Isso melhorou a atividade antimicrobiana do revestimento, com uma redução significativa na sobrevivência de *S. aureus* na superfície dos morangos revestidos com QGE. Além de prolongar a vida útil dos morangos, a combinação do revestimento com a aplicação de luz melhorou sua segurança microbiana e não comprometeu sua qualidade.

A outra possibilidade de estudo foi a de aplicação dos chamados NADES, solventes eutéticos naturais profundos, como meios de extração verdes para a recuperação de compostos fenólicos de matrizes vegetais, dentre elas a casca da romã. O solvente à base de cloreto de colina e ácido lático foi eficaz, em condições otimizadas, em extrair uma quantidade maior dos compostos majoritários das cascas da romã, cascas de amêndoa e bagaço de sabugueiro, do que uma solução etanólica 60% (v/v) nas mesmas condições de extração.

Assim, considerando-se esses resultados, apontam-se como perspectivas para trabalhos futuros:

- Aplicação do revestimento QGE em outros frutos, para avaliação da extensão de sua vida de prateleira;
- Escalonamento dos processos de preparo do revestimento e de sua aplicação nos frutos;
- Nova avaliação econômica, considerando-se o escalonamento;
- Avaliação do revestimento QGE como um filme de embalagem rígido;
- Aplicação dos extratos obtidos à base de NADES como carreadores de compostos fenólicos nos revestimentos de quitosana e gelatina;
- Avaliação do uso desses extratos como plasticizantes para os filmes;
- Aplicação dos revestimentos nos morangos e avaliação de sua qualidade físico-química, microbiológica e sensorial;
- Associação dos revestimentos contendo extratos à base de NADES e a terapia fotodinâmica e avaliação dessa combinação sobre a qualidade dos morangos;
- Avaliação de outros materiais para a formulação de NADES e de outras matrizes vegetais para a recuperação de compostos fenólicos.

BIBLIOGRAFIA

AALIYA, B.; SUNOOJ, K. V.; NAVAF, M.; AKHILA, P. P.; SUDHEESH, C.; MIR, S. A.; SABU, S.; SASIDHARAN, A.; HLAING, M. T.; GEORGE, J. Recent trends in bacterial decontamination of food products by hurdle technology: a synergistic approach using thermal and non-thermal processing techniques. **Food Research International**, Oxford, v. 147, p.110514, Sep. 2021.

ABBASTABAR, B.; AZIZI, M. H.; ADNANI, A.; ABBASI, S. Determining and modeling rheological characteristics of quince seed gum. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 43, p. 259-264, Jan. 2015.

ADILETTA, G.; DI MATTEO, M.; PETRICCIONE, M. Multifunctional role of chitosan edible coatings on antioxidant systems in fruit crops: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, p. 2633, Mar. 2021.

AKHTAR, S.; ISMAIL, T.; FRATERNALE, D.; SESTILI, P. Pomegranate peel and peel extracts: chemistry and food features. **Food Chemistry**, Oxford, v. 174, p. 417–425, May 2015.

ALANÓN, M.E.; IVANOVIĆ, M.; PIMENTEL-MORA, S.; BORRÁS-LINARES, I.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. A novel sustainable approach for the extraction of value-added compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by natural deep eutectic solvents. **Food Research International**, Oxford, v. 137, p. 109646, Nov. 2020.

ALBUQUERQUE, C. Aspectos logísticos afetam agronegócio do mamão. **A Lavoura**, Rio de Janeiro, n. 679, 2010.

ALMENAR, E.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; GAVARA, R. Evolution of selected volatiles in chitosan-coated strawberries (*Fragaria x ananassa*) during refrigerated storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, p. 974-980, Jan. 2009.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. **ASTM D882-12**: standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Philadelphia: ASTM International, 2012.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. **ASTM E96/E96M-16**: Standard test methods for water vapor transmission of materials. Annual book. Philadelphia: ASTM International, 2016.

ANTUNES, L. E. C.; BONOW, S.; REISSER JUNIOR, C. Morango. Crescimento constante em área e produção. **Revista Campo e Negócio**, Piracicaba, v. 37, p. 88-92, 2020.

ANTUNES, L. E. C.; CARVALHO, G. L.; SANTOS, A. M. **A cultura do morango**. 2. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011.

ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 16, p. 397-409, Jul. 2018.

ASSIS, O. B. G.; BRITTO, D. Coberturas comestíveis sobre frutas e hortaliças: fundamentos e prática. In: FERREIRA, M. D. (ed.). **Instrumentação pós-colheita em frutas e hortaliças**. Brasília, DF: Embrapa, 2017, p. 185-205.

ASSIS, O. B. G.; BRITTO, D. Review: edible protective coatings for fruits: fundamentals and applications. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 17, p. 87-97, Jun. 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 13526**: teste de comparação múltipla em análise sensorial dos alimentos e bebidas. Rio de Janeiro, ABNT, 1995. 9 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SUPERMERCADOS. **21ª Avaliação de perdas no varejo brasileiro de supermercados**. São Paulo: ABRAS, 2021. Disponível em: <https://static.abras.com.br/pdf/perdas2021.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2023.

AZABAĞAOĞLU, M.Ö. Investigating fresh fruit and vegetables losses at contemporary food retailers. **Social Sciences Research Journal**, Istanbul, v. 7, n. 4, p. 55-62, Dec. 2018.

AZAZA, Y. B.; HAMDİ, M.; CHARMETTE, C.; JRIDI, M.; LI, S.; NASRI, M.; NASRI, R. Development and characterization of active packaging films based on chitosan and sardinella protein isolate: effects on the quality and the shelf life of shrimps. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 31, p. 100796, Mar. 2022.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 2, n. 3, p. 27-34, Dez. 2007.

BAILEY, A. **California ranks No.1 for pomegranate production**. [S. l.]: Your Central Valley, 2022. Disponível em: <https://www.yourcentralvalley.com/eye-on-ag/california-ranks-no-1-for-pomegranate-production/>. Acesso em: 25 jun. 2023.

BARIKLOO, H.; AHMADI, E. Shelf-life extension of strawberry by temperatures conditioning, chitosan coating, modified atmosphere, and clay and silica nanocomposite packaging. **Scientia Horticulturae**, Basel, v. 240, p. 496–508, Oct. 2018.

BATISTA, P. F.; LIMA, M. A. C. D.; ALVES, R. E.; FAÇANHA, R. V. Bioactive compounds and antioxidant activity in tropical fruits grown in the lower-middle São Francisco Valley. **Crop Science**, Hoboken, v. 49, n. 4, Dec. 2018.

BELWAL, T.; HUANG, H.; LI, L.; DUAN, Z.; ZHANG, X.; AALIM, H.; LUO, Z. Optimization model for ultrasonic-assisted and scale-up extraction of anthocyanins from *Pyrus communis* 'Starkrimson' fruit peel. **Food Chemistry**, Oxford, v. 297, p. 124993, Nov. 2019.

BENVENUTTI, L.; ZIELINSKI, A. A. F.; FERREIRA, S. R. S. Which is the best food emerging solvent: IL, DES or NADES? **Trends in Food Science and Technology**, London, v. 90, p. 133–146, Jun. 2019

BERTOLO, M. R. V., MARTINS, V. C. A., PLEPIS, A. M. G., BOGUSZ JUNIOR, S. Utilization of pomegranate peel waste: natural deep eutectic solvents as a green strategy to recover valuable phenolic compounds. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 327, p. 129471, Dec. 2021.

BERTOLO, M. R. V.; DIAS, L. D.; LIMA, A. R.; AGUIAR, A. S. N.; ALVES, F.; SOUZA, M.; NAPOLITANO, H. B.; BAGNATO, V. S.; BOGUSZ JUNIOR, S. Photoantimicrobial chitosan-gelatin-pomegranate peel extract films for strawberries preservation: From microbiological analysis to in vivo safety assessment. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 253, p.127085, Sept. 2023.

BERTOLO, M. R. V.; DIAS, L. D.; OLIVEIRA FILHO, J. G.; ALVES, F.; MARANGON, C. A.; MARTINS, V. C. A.; FERREIRA, M. D.; BAGNATO, V. S.; PLEPIS, A. M. G.; BOGUSZ JUNIOR, S. Central composite design optimization of active and physical properties of food packaging films based on chitosan/gelatin/pomegranate peel extract. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 34, p. 100986, Dec. 2022.

BERTOLO, M. R. V.; MARTINS, V. C. A.; HORN, M. M.; BRENELLI, L. B.; PLEPIS, A. M. G. Rheological and antioxidant properties of chitosan/gelatin-based materials functionalized by pomegranate peel extract. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 228, p. 115386, Jan. 2020.

BERTOLO, M. R. V.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G.; BOGUSZ JUNIOR, S. Composições poliméricas com propriedades antioxidantes e antimicrobianas para revestimento de frutas, método de preparação do revestimento e seu uso. Depositante: Universidade de São Paulo. BR 10202102640. Depósito: 23 dez. 2021.

BINTSIS, T. Foodborne pathogens. **AIMS Microbiology**, Springfield, v. 3, p. 529–563, Jun. 2017.

BOGUSZ JUNIOR, S.; DE MELO, A. M. T.; ZINI, C. A.; GODOY, H. T. Optimization of the extraction conditions of the volatile compounds from chili peppers by headspace solid phase micro-extraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1218, n. 21, 3345-3350, May 2011.

BRUGNEROTTO, J.; DESBRIÈRES, J.; ROBERTS, G.; RINAUDO, M. Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. **Polymer**, Amsterdam, v. 42, n. 25, p. 9921-9927, Dec. 2001.

CAI, J.; LU, W.; KAN, Q.; CHEN, X.; CAO, Y.; XIAO, J. Volatile composition changes of fruits in a biopolymer-coated polyethylene active packaging: effects of modified atmosphere and packaging-shaped bacterial community. **Food Research International**, Oxford, v. 152, p. 110843, Feb. 2022.

CALIFORNIA DEPARTMENT OF FOOD AND AGRICULTURE. **California agriculture exports 2019-2020**. Sacramento: CDFA, 2020. Disponível em: https://www.cdfa.ca.gov/Statistics/PDFs/2020_Exports_Publication.pdf. Acesso em: 25 jun. 2023.

CAMPANA FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estrutura e propriedades de α - e β -quitina. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 644-650, Jan. 2007.

CAO, H.; SAROGLU, O.; KARADAG, A.; DIACONEASA, Z.; ZOCCATELLI, G.; CONTE-JUNIOR, C. A.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A.; OU, J.; BAI, W.; ZAMARIOLI, C. M.; FREITAS, L. A. P.; SHPIGELMAN, A.; CAMPELO, P. H.; CAPANOGLU, E.; HIL, C. L.; JAFARI, S. M.; QI, Y.; LIAO, P.; WANG, M.; ZOU, L.; BOURKE, P.; SIMAL-GANDARA, J.; XIAO, J. Available technologies on improving the stability of polyphenols in food processing. **Food Frontiers**, New Jersey, v. 2, n. 2, p. 109-139, Jun. 2021.

CARVALHO, C. P.; VILLANO, D.; MORENO, D. A.; SERRANO, M.; VALERO, D. Alginate edible coating and cold storage for improving the physicochemical quality of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). **HSOA Journal of Food Science & Nutrition**, Herndon, v. 1, p. 1-7, Aug. 2015.

CELIKSOY, V.; HEARD, C. M. Antimicrobial potential of pomegranate extracts. **IntechOpen (Online)**, Vienna, v. 1, p. 1-23, Feb. 2021.

CENTRO ESTADUAL DE ABASTECIMENTO. **Prohort - Programa Brasileiro de Modernização do Mercado de Hortigranjeiro**. Brasília, DF, CEASA, [202-?]. Disponível em: <http://www.ceasa.gov.br/precos.php>. Acesso em: 01 jul. 2023.

CHEN, T.; SHEN, Y.; WU, D.; WU, R.; SHENG, J.; FENG, X.; TANG, X. Biodegradable films of chitosan and tea polyphenols catalyzed by laccase and their physical and antioxidant activities. **Food Bioscience**, Oxford, v. 46, p. 101513, Apr. 2022.

CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH• assay using several statistical programs. **Food Chemistry**, Oxford, v. 138, p. 414-420, May 2013.

CHEYAD, M. S.; SALMAN, T. A. Pomegranate Peel Extract as Green Corrosion Inhibitor for α -Brassin 2M HCl Solution. **Journal of Materials Science & Surface Engineering**, Malpura, v. 5, n. 4, p. 597-601, Jun. 2017.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças**. Fisiologia e Manuseio. 2 ed. Lavras: FAEPE, 2005.

CHU, Y.; GAO, C.; LIU, X.; ZHANG, N.; XU, T.; FENG, X.; YANG, Y.; SHEN, C.; TANG, Z. Improvement of storage quality of strawberries by pullulan coatings incorporated with cinnamon essential oil nanoemulsion. **LWT**, Massachusetts, v. 122, p. 109054, Mar. 2020.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **CLSI M100-S28**: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 27th informational supplement. Wayne: CLSI, 2018.

COMPANHIA DE ENTREPÓSITOS E ARMAZÉNS GERAIS DE SÃO PAULO. **Morango**. Guia de identificação. São Paulo: CEAGESP, 2023. Disponível em: <https://ceagesp.gov.br/hortiescolha/hortipedia/morango/>. Acesso em: 17 out. 2023.

CORTEZ-VEGA, W. R.; PIOTROWICZ, I. B. B.; PRENTICE, C.; BORGES C. D. Conservação de mamão minimamente processado com uso de revestimento comestível à base de goma xantana. **Semina**: ciências agrárias, Londrina, v. 34, n. 4, p.1753-1764, 2013.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, Oct. 2010.

DAI, Y.; SPRONSEN, J.; WITKAMP, G.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 766, p. 61-68, Mar. 2013.

DELGADO, L.; SCHUSTER, M.; TORERO, M. On the origins of food loss. **Applied Economic Perspectives and Policy**, New Jersey, v. 43, p. 750–780, Mar. 2021.

DI PIERRO, P.; CHICO, B.; VILLALONGA, R.; MARINIELLO, L.; DAMIAO, A. E.; MAIS, P.; PORTA, R. Chitosan–whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: analysis of their mechanical and barrier properties. **Biomacromolecules**, Washington, v. 7, n. 3, p. 744-749, Mar. 2006.

DIAS, L. D.; BERTOLO, M. R. V.; ALVES, F.; DE FARIA, C. M. G.; RODRIGUES, M. A. V.; LOPES, L. K. C.; PLEPIS, A. M. G.; MATTOSO, L. H. C.; BOGUSZ JUNIOR, S.; BAGNATO, V. S. Preparation and characterization of curcumin and pomegranate peel extract chitosan/gelatin-based films and their photoinactivation of bacteria. **Materials Today Communications**, Amsterdam, v. 31, p. 103791, Jun. 2022.

DIAS, L. D.; BLANCO, K. C.; MFOUO-TYNGA, I. S.; INADA, N. M.; BAGNATO, V. S. Curcumin as a photosensitizer: from molecular structure to recent advances in antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology C Photochemistry Reviews**, Amsterdam, v. 45, p. 100384, Dec. 2020.

DIAS, L. D.; CORREA, T. Q.; BAGNATO, V. S. Cooperative and competitive antimicrobial photodynamic effects induced by a combination of methylene blue and curcumin. **Laser Physics Letters**, Bristol, v. 18, p. 075601, Jul. 2021.

DJAGNY, K. B.; WANG, Z.; XU, S. Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Oxfordshire, v. 41, n. 6, p. 481-492, Sep. 2001.

DOMÍNGUEZ, R.; PATEIRO, M.; MUNEKATA, P. E. S.; LÓPEZ, E. M. S.; RODRÍGUEZ, J. A.; BARROS, L.; LORENZO, J. M. Potential use of elderberry (*Sambucus nigra* L.) as natural colorant and antioxidant in the food industry. A review. **Foods**, Basel, v. 10, n. 11, p. 2713, Nov. 2021.

DUYMUS, H. G.; GÖGER, F.; BASER, K. H. C. In vitro antioxidant properties and anthocyanin compositions of elderberry extracts. **Food Chemistry**, Oxford, v. 155, p. 112-119, Jul. 2014.

DYSART, J. S.; SINGH, G.; PATTERSON, M. S. Calculation of singlet oxygen dose from photosensitizer fluorescence and photobleaching during mTHPC photodynamic therapy of MLL cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, Amsterdam, v. 81, p. 196-205, Jan-Feb. 2005.

EDDYA, M.; TBIB, B.; HAMI, K. A comparison of chitosan properties after extraction from shrimp shells by diluted and concentrated acids. **Heliyon**, Amsterdam, v. 6, p. e03486, Feb. 2020.

ELIK, A.; YANIK, D. K.; ISTANBULLU, Y.; GUZELSOY, N. A.; YAVUZ, A.; GÖGÜS, F. Strategies to reduce post-harvest losses for fruits and vegetables. **International Journal of Scientific and Technological Research**, Delhi, v. 5, n. 3, 2019.

ELMASSRY, M. M.; ZAYED, A.; FARAG, M. A. Gut homeostasis and microbiota under attack: impact of the different types of food contaminants on gut health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Oxfordshire, v. 62, n. 3, p. 738-763, 2022.

ENDO, E. H.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Activity of spray-dried microparticles containing pomegranate peel extract against *Candida albicans*. **Molecules**, Basel, v. 17, p. 10094-10107, Sep. 2012.

ESHGHI, S.; HASHEMI, M.; MOHAMMADI, A.; BADI, F.; MOHAMMADHOSEINI, Z.; AHMADI, K. Effect of nanochitosan-based coating with and without copper loaded on physicochemical and bioactive components of fresh strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duchesne) during storage. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 7, n. 8, p. 2397-2409, Feb. 2014.

FADAVI, G.; MOHAMMADIFAR, M. A.; ZARGARRAN, A.; MORTAZAVIAN, A. M.; KOMEILI, R. Composition and physicochemical properties of Zedo gum exudates from *Amygdalus scoparia*. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 101, p. 1074-1080, Jan. 2014.

FALGUERA, V.; QUINTERO, J. P.; JIMÉNEZ, A.; MUÑOZ, J. A.; IBARZ, A. Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. **Trends in Food Science and Technology**, London, v. 22, p. 292-303, Jun. 2011.

FAN, J.; FAN, Y.; PEI, Y.; WU, K.; WANG, J.; FAN, M. Solvent extraction of selected endocrine-disrupting phenols using ionic liquids. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v. 61, p. 324-331, Jul. 2008.

FAROOQI, A. A. Regulation of deregulated cell signaling pathways by pomegranate in different cancers: re-interpretation of knowledge gaps. **Seminars in Cancer Biology**, Massachusetts, v. 73, p. 294-301, Aug. 2021.

FERNANDES, C. C.; HAGHBAKHSR, R.; MARQUES, R.; PAIVA, A.; CARLYLE, L.; DUARTE, A. R. C. Evaluation of deep eutectic systems as an alternative to solvents in painting conservation. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, Washington, v. 9, n. 46, p. 15451-15460, Nov. 2021.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Massachusetts, v. 88, p. 252-259, Jul. 2007.

FERREIRA, M. D. Redução nas perdas pós-colheita em frutas e hortaliças. Um grande desafio. *In*: MAGNONI JUNIOR, L.; STEVENS, D.; SILVA, W. T. L.; VALLE, J. M. F.; PURINI, S. R. M.; MAGNONI, M. G. M.; SEBASTIÃO, E.; BRANCO JUNIOR, G.; ADORNO FILHO, E. F.; FIGUEIREDO, W. S.; SEBASTIÃO, I. (ed.). **JC na escola ciência, tecnologia e sociedade: mobilizar o conhecimento para alimentar o Brasil**. 2 ed. São Paulo: Centro Paula Souza, 2017. p. 36-43.

FERREIRA, M. D.; SPRICIGO, P. C.; SARGENT, S. A. Colheita e beneficiamento. *In*: FERREIRA, M. D. (ed.). **Instrumentação pós-colheita em frutas e hortaliças**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2017. p. 67-85.

FONSECA, S. C.; OLIVEIRA, F. A. R.; BRECHT, J. K. Modelling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages: a review. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 52, p. 99-119, Apr. 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of food and agriculture 2019**. Moving forward on food loss and waste reduction, 2019. Rome: FAO, 2019. Disponível em: <https://www.fao.org/3/ca6030en/ca6030en.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2023.

FRUSHOUR, B. G., KOENIG, J. L. Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin. **Biopolymers**, New Jersey, v. 14, p. 379–391, Feb. 1975.

FU, X.; WANG, D.; BELWAL, T.; XU, Y.; LI, L.; LUO, Z. Sonication-synergistic natural deep eutectic solvent as a green and efficient approach for extraction of phenolic compounds from peels of *Carya cathayensis* Sarg. **Food Chemistry**, Oxford, v. 355, p. 129577, Feb. 2021.

GARBUIO, M.; DIAS, L. D.; DE SOUZA, L. M.; CORREA, T. Q.; MEZZACAPPO, N. F.; BLANCO, K. C.; DE OLIVEIRA, K. T.; INADA, N. M.; BAGNATO, V. S. Formulations of curcumin and d-mannitol as a photolarvicide against *Aedes aegypti* larvae: sublethal photolarvicidal action, toxicity, residual evaluation, and small-scale field trial. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 38, Jun. 2022.

GARCIA, E. L.; MOJICEVIC, M.; MILIVOJEVIC, D.; ALEKSIC, I.; VOJNOVIC, S.; STEVANOVIC, M.; MURRAY, J.; ATTALLAH, O. A.; DEVINE, D.; FOURNET, M. B. Enhanced antimicrobial activity of biocompatible bacterial cellulose films via dual synergistic action of curcumin and triangular silver nanoplates. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 23, p. 12198, Oct. 2022.

GARCIA, L. C.; PEREIRA, L. M.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; HUBINGER, M. D. Effect of antimicrobial starch edible coating on shelf-life of fresh strawberries. **Packaging Technology and Science**, Oxford, v. 25, n. 7, p. 413-425, Nov. 2012.

GIL-GIRALDO, E. Y.; DUQUE-CIFUENTES, A. L.; QUINTERO-CASTAÑO, V. D. Obtaining minimally processed strawberry (*Fragaria x ananassa*) products and their physicochemical, microbiological, and sensory characterization by using edible coatings. **DYNA**, Medellín, v. 85, n. 207, p. 183-191, Oct.-Dec. 2018.

GIRI, S.; MUKHERJEE, A. Eco-corona reduces the phytotoxic effects of polystyrene nanoplastics in *Allium cepa*: emphasizing the role of ROS. **Environmental and Experimental Botany**, Switzerland, v. 198, p. 104850, Jun. 2022.

GIVI, F.; GHOLAMI, M.; MASSAH, M. Application of pomegranate peel extract and essential oil as a safe botanical preservative for the control of postharvest decay caused by *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum* on “Satsuma” mandarin. **Journal of Food Safety**, New Jersey, v. 39, n. 3, p. 12639, Jun. 2019.

GOL, N. B.; PATEL, P. R.; RAO, T. V. R. Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p.185-195, Nov. 2013.

GROLLEAUD, M. **Post-Harvest Losses: Discovering the Full Story**. Overview of the Phenomenon of Losses during the Post-Harvest System. FAO, Agro Industries and Post-Harvest Management Service, Rome, 2002.

GUERREIRO, A. C.; GAGO, C. M.; FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G.; ANTUNES, M. D. The use of polysaccharide-based edible coatings enriched with essential oils to improve shelf-life of strawberries. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 110, p. 51-60, Dec. 2015.

GUSTAVSSON, J.; CEDERBERG, C.; SONESSON, U.; OTTERDIJK, R.; MEYBECK, A. **Global food losses and food waste: extent, causes and prevention**. Study conducted for the International Congress SAVE FOOD! at Interpack2011 Düsseldorf, Germany. Rome: FAO, 2011. Disponível em: <https://reliefweb.int/attachments/0fb5d845-b91d-32a5-86f6-f5d1550bc2d4/FAO%20Report%202011%20%281%29.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2023.

HERNÁNDEZ-CARRILLO, J.; ORTA-ZAVALZA, E.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, S.; MONTOYA-TORRES, C.; SEPÚLVEDA-AHUMADA, D.; ORTIZ-RIVERA, Y. Evaluation of the effectivity of reuterin inpectin edible coatings to extend the shelf-life of strawberries during cold storage. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 30, p.100760, Dec. 2021.

HERPPICH, W. B.; ZSOM, T. Comprehensive assessment of the dynamics of banana chilling injury by advanced optical techniques. **Applied Sciences**, Basel, v. 11, p. 11433, 2021.

HENZ, G. P; PORPINO, G. Food losses and waste: how Brazil is facing this global challenge? **Horticultura brasileira**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 472-482, Dez. 2017.

HORN, M.; MARTINS, V.; PLEPIS, A. Interaction of anionic collagen with chitosan: effect on thermal and morphological characteristics. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 77, n. 2, p. 239-243, Jun. 2009.

HU, H.; YAO, X.; QIN, Y.; YONG, H.; LIU, J. Development of multifunctional food packaging by incorporating betalains from vegetable amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) into quaternary ammonium chitosan/fish gelatin blend films. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 159, p. 675–684, Sep. 2020.

HU, X. Q.; HUANG, Y. Y.; WANG, Y. G.; WANG, X. Y.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections. **Frontiers in Microbiology**, Amsterdam, v. 9, p. 1299, Jun. 2018.

IKEGAYA, A.; OHBA, S.; NAKAJIMA, T.; TOYOIZUMI, T.; ITO, S.; ARAI, E. Practical long-term storage of strawberries in refrigerated containers at ice temperature. **Food Science & Nutrition**, Herndon, v. 8, p. 5138-5148, Aug. 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção de romã**. Rio Janeiro: IBGE, 2017. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/roma/br>. Acesso em: 01 jul. 2023.

ISMAIL, B. B.; GUO, M.; PU, Y.; WANG, W.; YE, X.; LIU, D. Valorisation of baobab (*Adansonia digitata*) seeds by ultrasound assisted extraction of polyphenolics. Optimisation and comparison with conventional methods. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 52, p. 257-267, Apr. 2019.

ISTIQOMAH, A.; UTAMI, M. R.; FIRDAUS, M.; SURYANTI, V.; KUSUMANINGSIH, T. Antibacterial chitosan-*Dioscorea alata* starch film enriched with essential oils optimally prepared by following response surface methodology. **Food Bioscience**, Oxford, v. 46, p. 101603, Apr. 2022.

JAFARZADEH, S.; NAFCHI, A. M.; SALEHABADI, A.; OLADZAD-ABBASABADI, N.; JAFARI, S. M. Application of bio-nanocomposite films and edible coatings for extending the shelf life of fresh fruits and vegetables. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 291, p.102405, May 2021.

JOSHI, P.; BECERRA-MORA, N.; VARGAS-LIZARAZO, A. Y.; KOHLI, P.; FISHER, D. J.; CHOUDHARY, R. Use of edible alginate and limonene-liposome coatings for shelf-life improvement of blackberries. **Future Foods**, Amsterdam, v. 4, p.100091, Dec. 2021.

JURIĆ, T.; UKA, D.; HOLLÓ, B. B.; JOVIĆ, B.; KORDIĆ, B.; POPOVIĆ, B. M. Comprehensive physicochemical evaluation of choline chloride-based natural deep eutectic solvents. **Journal of Molecular Liquids**, Amsterdam, v. 343, p. 116968, Dec. 2021.

KADER, A. A. Fruit maturity, ripening, and quality relationships. **Acta Horticulturae**. Leuven, p. 203–208, 1999.

KADER, A. A.; ROLLE, R. S. The role of postharvest management in assuring the quality and safety of horticultural produce. Rome: FAO, 2004. p. 51.

KAHLAOUI, M.; VECCHIA, S. B. D.; GIOVINE, F.; KBAIER, H. B. H.; BOUZOUITA, N.; PEREIRA, L. B.; ZEPPA, G. Characterization of polyphenolic compounds extracted from different varieties of Almond Hulls (*Prunus dulcis* L.). **Antioxidants**, Basel, v. 8, n. 12, p. 647, Dec. 2019.

KAHRAMANOĞLU, I.; BAHADIRLI, N. P.; OKATAN, V.; WAN, C. C. Impacts of edible coatings enriched with laurel essential oil on the storage life of strawberry 'Camarosa' fruits. **Bragantia**, Campinas, v. 81, p. 1922, 2022.

KAYA, M.; RAVIKUMARA, P.; ILK, S.; MUJTABA, M.; AKYUZ, L.; LABIDI, J.; SALABERRIAER, A. M.; CAKMAK, Y. S.; ERKUL, S. K. Production and characterization of chitosan based edible films from *Berberis crataegina's* fruit extract and seed oil. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 45, p. 287-297, Feb. 2018.

KHEZERLOU, A.; JAFARI, S. M. Nanoencapsulated bioactive components for active food packaging. *In: HANDBOOK of food nanotechnology*. Amsterdam: Elsevier, 2020. p. 493-532.

KHODAEI, D.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; RAHMATI, E. Effect of edible coatings on the shelf life of fresh strawberries: a comparative study using TOPSIS-Shannon entropy method. **NFS Journal**, Berlin, v. 23, p. 17-23, Jun. 2021.

KITANO, M. Updating of OECD guidelines for the testing of chemicals. **Water Science and Technology**, London, v. 25, p. 465-472, 1992.

KOWALCZYK, D.; KORDOWSKA-WIATER, M.; ZIĘBA, E.; BARANIAK, B. Effect of carboxymethylcellulose/candelilla wax coating containing potassium sorbate on microbiological and physicochemical attributes of pears. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 218, p. 326-333, Apr. 2017.

KULOGLU, S. S.; YALCIN, E.; CAVUSOGLU, K.; ACAR, A. Dose-dependent toxicity profile and genotoxicity mechanism of lithium carbonate. **Scientific Reports**, New York, v. 12, p. 13504, Aug. 2022.

KUMAR, N.; NEERAJ; PRATIBHA; SINGLA, M. Enhancement of storage life and quality maintenance of litchi (*Litchi Chinensis Sonn.*) fruit using chitosan: pullulan blend antimicrobial edible coating. **International Journal of Fruit Science**, Oxfordshire, v. 20, n. S3, p. S1662-S1680, 2020.

KUMAR, N.; PRATIBHA; NEERAJ; OJHA, A.; UPADHYAY, A.; SINGH, R.; KUMAR, S. Effect of active chitosan-pullulan composite edible coating enrich with pomegranate peel extract on the storage quality of green bell pepper. **LWT**, Massachusetts, v. 138, p. 110435, Mar. 2021.

KUMAR, N.; PRATIBHA; NEERAJ; PETKOSKA, A. T.; AL-HILIFI, S. A.; FAWOLE, O. A. Effect of chitosan-pullulan composite edible coating functionalized with pomegranate peel extract on the shelf life of mango (*Mangifera indica*). **Coatings**, Basel, v. 11, p. 764, Jun. 2021.

KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, New York, v. 8, n. 3, p. 203-226, Mar. 2006.

LAVERTU, M.; XIA, Z.; SERREQUI, A. N.; BERRADA, M.; RODRIGUES, A.; WANG, D.; BUSCHMANN, M. D.; GUPTA, A. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 32, n. 6, p. 1149-1158, Aug. 2003.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Rockville, v. 88, n. 5, p. 1269-1278, Sep. 2005.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research-Reviews in Mutation Research**, Amsterdam, v. 682, p. 71-81, Aug. 2009.

LIMA, R.; FEITOSA, L.; PEREIRA, A. D. S.; DE MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C.; FRACETO, L. F. Evaluation of the genotoxicity of chitosan nanoparticles for use in food packaging films. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, p. 89-96, Aug. 2010.

LIN, Y. L.; HU, J. M.; LI, S. Y.; HAMZAH, S. S.; JIANG, H. Q.; ZHOU, A. R.; ZENG, S. X.; LIN, S. L. Curcumin-based photodynamic sterilization for preservation of fresh-cut Hami melon. **Molecules**, Basel, v. 24, n. 13, p. 2374, Jun. 2019.

LING, J. K. U.; CHAN, Y. S.; NANDONG, J.; CHIN, S. F.; HO, B. K. Formulation of choline chloride/ascorbic acid natural deep eutectic solvent: characterization, solubilization capacity and antioxidant property. **LWT**, Massachusetts, v. 133, p. 110096, Nov. 2020.

LIU, Y.; KONG, K. W.; WU, D. T.; LIU, H. Y.; LI, H. B.; ZHANG, J. R.; GAN, R. Y. Pomegranate peel-derived punicalagin: ultrasonic-assisted extraction, purification, and its α -glucosidase inhibitory mechanism. **Food Chemistry**, Oxford, v. 374, p. 131635, Apr. 2022.

LIU, Y.; TIKUNOV, Y.; SCHOUTEN, R. E.; MARCELIS, L. F.; VISSER, R. G.; BOVY, A. Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in solanaceous vegetables: a review. **Frontiers in Chemistry**, Lausanne, v. 6, p. 52, Mar. 2018.

LIU, Y.; WANG, S.; LAN, W.; QIN, W. Fabrication and testing of PVA/chitosan bilayer films for strawberry packaging. **Coatings**, Basel, v. 7, p. 1-16, Jul. 2017.

LIU, Z. Y.; ZOU, H.; ZHAO, Z.; ZHANG, P. F.; SHAN, G. G.; KWOK, R. T. K.; LAM, J. W. Y.; ZHENG, L.; TANG, B. Z. Tuning organelle specificity and photodynamic therapy efficiency by molecular function design. **ACS Nano**, Washington, v. 13, p. 11283-11293, Oct. 2019.

LU, Y.; LUO, Q.; CHU, Y.; TAO, N.; DENG, S.; WANG, L.; LI, L. Application of gelatin in food packaging: a review. **Polymers**, Basel, v. 14, p. 436, Jan. 2022.

LUCIANO, C. G.; CHACON, W. D. C.; VALENCIA, G. A. Starch-based coatings for food preservation: a review. **Starch**, Weinheim, v. 74, n. 5-6, p. 2100279, May 2022.

LUVIELMO, M. M.; LAMAS, S. V. Revestimentos comestíveis em frutas. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, São Leopoldo, v. 8, n. 1, p. 8-15, 2012.

MAGANGANA, T. P.; MAKUNGA, N. P.; FAWOLE, O. A.; OPARA, U. L. Processing factors affecting the phytochemical and nutritional properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel waste: a review. **Molecules**, Basel, v. 25, p. 4690, Oct. 2020.

MANDALA, I. G.; SAVVAS, T. P.; KOSTAROPOULOS, A. E. Xanthan and locust bean gum influence on the rheology and structure of a white model-sauce. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 64, p. 335-342, Sep. 2004.

MANSINHOS, I.; GONÇALVES, S.; RODRÍGUEZ-SOLANA, R.; ORDÓÑEZ-DÍAZ, J. L.; MORENO-ROJAS, J. M.; ROMANO, A. Ultrasonic-assisted extraction and natural deep eutectic solvents combination: a green strategy to improve the recovery of phenolic compounds from *Lavandula pedunculata* subsp. lusitanica (Chaytor) Franco. **Antioxidants**, Basel, v. 10, p. 582, Apr. 2021.

MARIOD, A. A.; ADAM, H. F. Review: gelatin, source, extraction and industrial applications. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, Poznań, v. 12, n. 2, p. 135-147, Jun. 2013.

MARQUES, L. A. **Analytical development for organochlorinated compounds determination in milk**. Orientador: Stanislau Bogusz Junior. 2021. 138 f. Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

MARTINS, D. R.; BARBOSA, N. C.; RESENDE, E. D. Respiration rate of Golden papaya stored under refrigeration and with different controlled atmospheres. **Food Science and Technology**, Piracicaba, v. 71, p. 369-373, Oct. 2014.

MARTINS-RAMOS, D.; BORTOLUZZI, R.L.C.; MANTOVANI, A. Plantas medicinais de um remascente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana, Urupema, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. Botucatu, v. 12, n. 3, p. 380-397, Set. 2010.

MATHEW, S.; BRAHMAKUMAR, M.; ABRAHAM, E. T. Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal, and swelling properties of starch–chitosan blend films. **Biopolymers**, New Jersey, v. 82, p. 176-187, Jun. 2006.

MEGHA, M.; GILL, P. S.; JAWANDHA, S. K.; KAUR, N.; GILL, M. S. Effect of chitosan coating incorporated with pomegranate peel extract on pear fruit softening, quality, and cell wall degrading enzymes during cold storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, New Jersey, v. 45, e15984, Sep. 2021.

MELIKOĞLU, A. Y.; HAYATIOĞLU, N.; HENDEKÇI, M. C.; TEKIN, I.; ERSUS, S. Development and characterization of edible films based on carboxymethyl cellulose enriched with pomegranate seed oil and the coating of strawberries. **Journal of Food Processing and Preservation**, New Jersey, v. 46, n. 7, p. 16607, Jul. 2022.

MENZEL, C. M. Effect of temperature on soluble solids content in strawberry in Queensland, Australia. **Horticulturae**, Basel, v. 8, p. 367, Apr. 2022.

MIELE, N. A.; VOLPE, S.; TORRIERI, E.; CAVELLA, S. Improving physical properties of sodium caseinate based coating with the optimal formulation: effect on strawberries' respiration and transpiration rates. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 331, p. 111123, Oct. 2022.

MOHAMMAD, S. M.; KASHANI, H. H. Chemical composition of the plant *Punica granatum* L. (Pomegranate) and its effect on heart and cancer. **Journal of Medicinal Plants Research**, Sapele, v. 6, n. 40, p. 5306-5310, Oct. 2012.

MOUSAVI, S. R.; RAHMATI-JONEIDABAD, M.; NOSHAD, M. Effect of chia seed mucilage/bacterial cellulose edible coating on bioactive compounds and antioxidant activity of strawberries during cold storage. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 190, p. 618-623, Nov. 2021.

NAIR, M. S.; SAXENA, A.; KAUR, C. Effect of chitosan and alginate based coatings enriched with pomegranate peel extract to extend the postharvest quality of guava (*Psidium guajava* L.). **Food Chemistry**, Oxford, v. 240, p. 245-252, Feb. 2018.

NAIR, S. B.; JYOTHI, A. N.; SAJEEV, M. S.; MISRA, R. Rheological, mechanical and moisture sorption characteristics of cassava starch-konjac glucomannan blend films. **Starch**, Weinheim, v. 63, n. 11, p. 728-739, 2011.

NAJI-TABASI, S.; MOHAMMAD, S.; RAZAVI, A. New studies on basil (*Ocimum bacilicum* L) seed gum: part III e steady and dynamic shear rheology. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 67, p. 243-250, Jun. 2017.

NANDI, L. G. Caracterização e modificação hidrofóbica do polissacarídeo Lentinan extraído do cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*) e estudos da sua autoassociação na presença de sulfobetáinas. Orientador: Edson Minatti: 2011. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

NARASAGOUDR, S. S.; HEGDE, V. G.; CHOUGALE, R. B.; MASTI, S. P.; VOOTLA, S.; MALABADI, R. B. Physico-chemical and functional properties of rutin induced chitosan/poly (vinyl alcohol) bioactive films for food packaging applications. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 109, p.106096, Dec. 2020.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Drug dictionary**. [S. l.]: NCI, [202-?]. Disponível em: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/fruit-and-vegetable-extract>. Acesso em: 01 jul. 2023.

NAYAK, S. L.; SETHI, S.; SHARMA, R. R.; PRAJAPATI, U. Active edible coatings for fresh fruits and vegetables. *In*: GUTIÉRREZ, T. J. (ed.). **Polymers for agri-food applications**. Cham: Springer, 2019.

NOTTAGH, S.; HESARI, J.; PEIGHAMBARDoust, S. H.; REZAEI-MOKARRAM, R.; JAFARIZADEH-MALMIRI, H. Effectiveness of edible coating based on chitosan and Natamycin on biological, physico-chemical and organoleptic attributes of Iranian ultra-filtrated cheese. **Biologia**, New York, v. 75, p. 605–611, Nov. 2019.

NOWZARI, F.; SHÁBANPOUR, B.; OJAGH, S. M. Comparison of chitosan-gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. **Food Chemistry**, Oxford, v. 141, n. 3, p. 1667-1672, Dec. 2013.

NUNES, M. C. N. Color atlas of postharvest quality of fruits and vegetables. Ames: Willey Blackwell, 2008.

NUNES, M. C. N.; MORAIS, A. M. M. B.; BRECHT, J. K.; SARGENT, S. A.; BARTZ, J. A. Cooling reduces incidence and severity of decay caused by botrytis cinerea and rhizopus stolonifer in strawberry. **HortTechnology horttech**, Alexandria, v. 15, n. 1, p. 153-156, 2005.

OKONOZI, S.; DUANGRAT, C.; ANUCHPREEDA, S.; TACHAKITTIRUNGROD, S.; CHOWWANAPOONPOHN, S. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. **Food Chemistry**, Oxford, v. 103, p. 839-846, 2007.

OLIVEIRA FILHO, J. G. O.; RODRIGUES, J. M.; VALADARES, A. C. F.; ALMEIDA, A. B.; LIMA, T. M.; TAKEUCHI, K. P.; ALVES, C. C. F.; SOUSA, H. A. F.; SILVA, E. R.; DYSZY, F. H.; EGEE, M. B. Active food packaging: Alginate films with cottonseed protein hydrolysates. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 92, p. 267-275, Jul. 2019.

OLIVEIRA FILHO, J. G.; ALBIERO, B. R.; CALISTO, I. H.; BERTOLO, M. R. V.; OLDONI, F. C. A.; EGEE, M. B.; BOGUSZ JUNIOR, S.; AZEREDO, H. M. C.; FERREIRA, M. D. Bio-nanocomposite edible coatings based on arrowroot starch/cellulose nanocrystals/carnauba wax nanoemulsion containing essential oils to preserve quality and improve shelf life of strawberry. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 219, p. 812-823, Oct. 2022.

OLIVEIRA FILHO, J. G.; BERTOLO, M. R. V.; BRITO, S. C.; MALAFATTI, J. O. D.; BERTAZZO, G. B.; COLACIQUE, M. N.; PARIS, E. C.; BOGUSZ JUNIOR, S.; FERREIRA, M. D. Recent advances in the application of nanotechnology to reduce fruit and vegetable losses during post-harvest. **Brazilian Journal of Physics**, São Paulo, v. 52, p. 126, May 2022.

OLIVEIRA FILHO, J. G.; BEZERRA, C. C. O. N.; ALBIERO, B. R.; OLDONI, F. C. A.; MIRANDA, M.; EGEA, M. B.; AZEREDO, H. M. C.; FERREIRA, M. D. New approach in the development of edible films: The use of carnauba wax micro- or nanoemulsions in arrowroot starch-based films. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 26, p. 200589, Dec. 2020.

OLIVEIRA FILHO, J. G.; SILVA, G. C.; OLDONI, F. C. A.; MIRANDA, M.; FLORENCIO, C.; OLIVEIRA, R. M. D.; GOMES, M. P.; FERREIRA, M. D. Edible coating based on carnauba wax nanoemulsion and *Cymbopogon martinii* essential oil on papaya postharvest preservation. **Coatings**, Basel, v. 12, n. 11, p. 1700, Nov. 2022.

OMEROGLU, P. Y.; ACOGLU, B.; ÖZDAL, T.; TAMER, C.E.; ÇOPUR, Ö.U. Extraction techniques for plant-based bio-active compounds. *In*: SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S. (ed.). **Natural bio-active compounds. Chemistry, pharmacology and health care practices**. Singapore: Elsevier, 2019. v. 2, p. 465-492.

ONU VERDE. **Produzidos e jamais consumidos: um guia visual sobre o desperdício de alimentos**. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <http://www.onuverde.org.br/Artigo/108/Produzidos-e-jamais-consumidos-um-guia-visual-sobre-o-desperdicio-de-alimentos>. Acesso em: 19 mar 2023.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **The sustainable development goals report 2022**. New York: ONU, 2022. Disponível em: https://amrefusa.org/sustainable-development-goals/?gclid=CjwKCAjw5dqqBhBNEiwA7PryaJVHkMrfLIRPAc7En2ic2pj7JdN2Z5avFvdBofwgCpDLmbdUZddJWBoCN9QQAvD_BwE. Acesso em: 01 jul. 2023.

OTONI, C. G., AZEREDO, H. M. C., MATTOS, B. D., BEAUMONT, M., CORREA, D. S., ROJAS, O. J. The food–materials nexus: next generation bioplastics and advanced materials from agri-food residues. **Advanced Materials**, New Jersey, v. 33, p. 2102520, Sep. 2021.

PAGLIARULO, C.; DE VITO, V.; PICARIELLO, G.; COLICCHIO, R.; PASTORE, G.; SALVATORE, P.; VOLPE, M. G. Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Food Chemistry**, Oxford, v. 190, p. 824-831, Jan. 2016.

PAIVA, A.; CRAVEIRO, R.; AROSO, I.; MARTINS, M.; REIS, R. L.; DUARTE, A. R. C. Natural deep eutectic solvents – solvents for the 21st century. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, Washington, v. 2, p. 1063-1071, Mar. 2014.

PAL, J.; RAJU, C. V.; PANDEY, G.; RAJ, R.; SINGH, R. R. Antioxidant activity of pomegranate peel extract and its effect on storage stability of cooked meat model system of indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) stored at 4±2°C. **Biochemical and Cellular Archives**, Muzaffarnagar, v. 17, n. 1, p. 183-187, Jan. 2017.

PALSIKOWSKI, P. A.; ROBERTO, M. M.; SOMMAGGIO, L. R. D.; SOUZA, P. M. S.; MORALES, A. R.; MARIN-MORALES, M. A. Ecotoxicity evaluation of the biodegradable polymers PLA, PBAT and its blends using *Allium cepa* as test organism. **Journal of Polymers and the Environment**, New York, v. 26, p. 938-945, Apr. 2018.

PANAHIRAD, S.; DADPOUR, M.; PEIGHAMBARDoust, S. H.; SOLTANZADEH, M.; GULLÓN, B.; ALIREZALU, K.; LORENZO, J. M. Applications of carboxymethyl cellulose- and pectin-based active edible coatings in preservation of fruits and vegetables: a review. **Trends in Food Science & Technology**, London, v. 110, p. 663-673, Apr. 2021.

PANDEY, A.; TRIPATHI, S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, Bach, v. 2, p. 115-119, 2014.

PANIAGUA, C.; SANTIAGO-DOMÉNECH, N.; KIRBY, A. R.; GUNNING, A. P.; MORRIS, V. J.; QUESADA, M. A.; MERCADO, J. A. Structural changes in cell wall pectins during strawberry fruit development. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 118, p. 55-63, Sep. 2017.

PAREEK, S. Novel postharvest treatments of fresh produce. Roca Raton: CRC Press, 2018.

PARKIN, K. L.; MARANGON, A.; JACKMAN, R. L.; YADA, R. Y.; STANLEY, D. W. Chilling injury. A review of possible mechanisms. **Journal of Food Biochemistry**, Hoboken, v. 13, p. 127-153, 1989.

PARRA-PALMA, C.; MORALES-QUINTANA, L.; RAMOS, P. Phenolic content, color development, and pigment related gene expression: a comparative analysis in different cultivars of strawberry during the ripening process. **Agronomy**, Basel, v. 10, p. 588, Apr. 2020.

PARREIDT, T. S.; MÜLLER, K.; SCHMID, M. Alginate-based edible films and coatings for food packaging applications. **Foods**, Basel, v. 7, n. 10, p. 170, Oct. 2018.

PAUL, V.; PANDEY, R. J. Role of internal atmosphere on fruit ripening and storability - a review. **Journal of Food Science and Technology**, New Delhi, v. 51, p. 1223-1250, Jul. 2014.

PAVLATH, A. E.; ORTS, W. Edible films and coatings: why, what and how? In: HUBER, K. C.; EMBUSCADO, M. E. (ed.) **Edible films and coatings for food applications**. New York: Springer, 2009, p. 1-23.

PENG, Y., WU, Y.; LI, Y. Development of tea extracts and chitosan composite films for active packaging materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 59, p. 282-289, Aug. 2013.

PENG, Y.; LI, Y. Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 36, p. 287-293, May 2014.

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

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

PEREZ, A. G.; SANZ, C.; OLIAS, R.; OLIAS, J. M. Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening strawberry fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, p. 249-253, 1999.

PETRASCH, S.; KNAPP, S. J.; VAN KAN, J. A. L.; BLANCO-ULATE, B. Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant Pathology**, New Jersey, v. 20, n. 6, p. 877-892, Apr. 2019.

PINHEIRO, G. P.; GALBIATTI, M. I.; CARNEIRO, M. J.; SAWAYA, A. C. H. F. Comparison of four different solid-phase microextraction fibers for analysis of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. leaf volatiles. **Advancement in Medicinal Plant Research**, Sapele, v. 7, n. 2, p. 38-43, Apr. 2019.

PINTON, S.; DIAS, F., F. G.; LERNO, L. A.; BARILE, D.; BELL, J. M. L. N. M. Revitalizing unfermented cabernet sauvignon pomace using an eco-friendly, two-stage countercurrent process: role of pH on the extractability of bioactive phenolics. **Processes**, Basel, v. 10, p. 2093, Oct. 2022.

POPESCU, P. A.; PALADE, L. M.; NICOLAE, I. C.; POPA, E. E.; MITELUȚ, A. C.; DRĂGHICI, M. C.; MATEI, F.; POPA, M. E. Chitosan-based edible coatings containing essential oils to preserve the shelf life and postharvest quality parameters of organic strawberries and apples during cold storage. **Foods**, Basel, v. 11, n. 21, p. 3317, Oct. 2022.

QU, W.; BREKSA III, A. P.; PAN, Z.; MA, H.; MCHUGH, T. H. storage stability of sterilized liquid extracts from pomegranate peel. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 77, n. 7, p. 765-772, Jul. 2012.

QUINTANA, S. E.; LLALLA, O.; GARCÍA-RISCO, M. R.; FORNARI, T. Comparison between essential oils and supercritical extracts into chitosan-based edible coatings on strawberry quality during cold storage. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 171, p. 105198, May 2021.

RAMÍREZ, C.; GALLEGOS, I.; IHL, M.; BIFANI, V. Study of contact angle, wettability and water vapor permeability in carboxymethylcellulose (CMC) based film with murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) extract. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 109, n. 3, p. 424-429, Apr. 2012.

RANJHA, M. M. A. N.; AMJAD, S.; ASHRAF, S.; KHAWAR, L.; SAFDAR, M. N.; JABBAR, S.; NADEEM, M.; MAHMOOD, S.; MURTAZA, M. A. Extraction of Polyphenols from apple and pomegranate peels employing different extraction techniques for the development of functional date bars. **International Journal of Fruit Science**, Philadelphia, v. 20, n. 3, p. S1201-S1221, 2020.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, Massachusetts, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, May 1999.

REIS, A.; COSTA, H. Principais doenças do morangueiro no Brasil e seu controle. **Embrapa Hortaliças**. Circular Técnica 96, Brasília, DF, 2011.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, Oxford, v. 31, p. 603-632, Jul. 2006.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, Oxford, v. 66, p. 401-436, Sept. 1999.

RODRIGUES, M. A. V. R.; BERTOLO, M. R. V.; MARANGON, C. A.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Chitosan and gelatin materials incorporated with phenolic extracts of grape seed and jabuticaba peel: rheological, physicochemical, antioxidant, antimicrobial and barrier properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 160, p. 769-779, Oct. 2020.

ROHASMIZAH, H.; AZIZAH, M. Pectin-based edible coatings and nanoemulsion for the preservation of fruits and vegetables: a review. **Applied Food Research**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 100221, Dec. 2022.

ROJAS, A. M.; GERSCHENSON, L. N. Ascorbic acid destruction in aqueous model systems: an additional discussion. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 81, n. 15, p. 1433-1439, Oct. 2001.

ROY, S.; RHIM, J. W. Fabrication of bioactive binary composite film based on gelatin/chitosan incorporated with cinnamon essential oil and rutin. **Colloids and Surfaces B**, Amsterdam, v. 204, p. 111830, Aug. 2021.

SAEED, M.; AZAM, M.; AHMAD, T.; AKHTAR, S.; HUSSAIN, M.; NASIR, S.; AIN, S. U. Utilization of pomegranate peel extract as antifungal coating agent against *Fusarium oxysporum* on tomatoes. **Journal of Food Processing and Preservation**, New Jersey, v. 46, p. 17157, May 2022.

SAHARIAH, P.; MÁSSON, M. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: a review of the structure–activity relationship. **Biomacromolecules**, Washington, v. 18, p. 3846-3868, Sep. 2017.

SALEM, M. N.; ALBANNA, L. S.; AWWAD, A. M. Nano-structured zinc sulfide to enhance *Cucumis Sativus* (cucumber) plant growth. **ARPN Journal of Agricultural and Biological Science**, Pakistan, v. 12, n. 5, p. 167-173, May 2017.

SÁNCHEZ-RANGEL, J. C.; BENAVIDES, J.; HEREDIA, J. B.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 5, p. 5990-5999, Aug. 2013.

SANTOS, A. E. O.; ASSIS, J. S.; BATISTA, P. F.; SANTOS, O. O. Utilização de atmosfera modificada na conservação pós-colheita de mangas ‘Tommy Atkins’. **Revista Semiárido De Visu**, Petrolina, v.1, n.1, p. 10-17, 2011.

SCHERER, M. D.; SPOSITO, J. C. V.; FALCO, W. F.; GRISOLIA, A. B.; ANDRADE, L. H. C.; LIMA, S. M.; MACHADO, G.; NASCIMENTO, V. A.; GONCALVES, D. A.; WENDER, H.; OLIVEIRA, S. L.; CAIRES, A. R. L. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on meristematic cells of *Allium cepa* roots: a close analysis of particle size dependence. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 660, p. 459-467, Apr. 2019.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, Oxford, v. 112, n. 13, p. 654-658, Feb. 2009.

SCHIFFERSTEIN, H. N.; WEHRLE, T.; CARBON, C. C. Consumer expectations for vegetables with typical and atypical colors: the case of carrots. **Food Quality and Preference**, Oxford, v. 72, p. 98-108, Mar. 2019.

SHAHIDI, F.; YEO, J.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; JACOBO-VELAZQUEZ, D. Insoluble-bound phenolics in food. **Molecules**, Basel, v. 21, p. 1216, Sep. 2016.

SHARIFI, K. A.; PIRSA, S. Biodegradable film of black mulberry pulp pectin/chlorophyll of black mulberry leaf encapsulated with carboxymethylcellulose/silica nanoparticles: Investigation of physicochemical and antimicrobial properties. **Materials Chemistry and Physics**, Amsterdam, v. 267, p. 124580, Jul. 2021.

SHIEKH, R. A.; MALIK, M. A.; AL-THABAITI, S. A.; SHIEKH, M. A. Chitosan as a novel edible coating for fresh fruits. **Food Science and Technology Research**, Ibaraki, v. 19, n. 2, p. 139-155, 2013.

SIKORA, M.; SWIECA, M. Effect of ascorbic acid postharvest treatment on enzymatic browning, phenolics and antioxidant capacity of stored mung bean sprouts. **Food Chemistry**, Oxford, v. 239, p. 1160-1166, Jan. 2018.

SILVA, C. M.; LIMA, A. R.; ABELHA, T. F.; LIMA, T. H. N.; CAIRES, C. S. A.; ACUNHA, T. V.; ARRUDA, E. J.; OLIVEIRA, S. L.; IGLESIAS, B. A.; CAIRES, A. R. L. Photodynamic control of *Aedes aegypti* larvae with environmentally-friendly tetra-platinated porphyrin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, Amsterdam, v. 224, p. 112323, Nov. 2021.

SILVA, M. N. **Incorporação de curcumina e cristais de curcumina em revestimento comestível à base de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)**. 2018. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

SILVA-WEISS, A.; IHL, M.; SOBRAL, P. J. A.; GUILLÉN, M. C. G.; BIFANI, V. Natural additives in bioactive edible films and coatings: functionality and applications in foods. **Food Engineering Reviews**, New York, v. 5, p. 200-216, 2013.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, Massachusetts, v. 299, p. 152-178, 1999.

SMITH, T.; ECKL, V.; REYNOLDS, C. M. Herbal supplement sales in US increase by record-breaking 17.3% in 2020. **HerbalGram**, Austin, v. 131, p. 52-65, 2020.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. East Lansing: Freeman Press, 1996.

STEWART, P. S.; BJARNSHOLT, T. Risk factors for chronic biofilm-related infection associated with implanted medical devices. **Clinical Microbiology and Infection**, Basel, v. 26, p.1034-1038, Feb. 2020.

SUDARSHAN, N. R.; HOOVER, D. G.; KNORR, D. Antibacterial action of chitosan. **Food Biotechnology**, Philadelphia, v. 6, p. 257-272, 1992.

TANG, Y.; DU, Y.; HU, X.; SHI, X.; KENNEDY, J. F. Rheological characterisation of a novel thermosensitive chitosan/poly(vinyl alcohol) blend hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 67, n. 4, p. 491-499, Feb. 2007.

TAO, R.; ZHANG, F.; TANG, Q. J.; XU, C. S.; NI, Z. J.; MENG, X. H. Effects of curcumin-based photodynamic treatment on the storage quality of fresh-cut apples. **Food Chemistry**, Oxford, v. 274, p. 415-421, Aug. 2018.

TATLIDIL, F. F.; DELLAL, I.; BAYRAMOĞLU, Z. **Food losses and waste in Turkey**. Country Report. Rome: FAO, 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-au824e.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2023.

THAKALI, A.; MACRAE, J. D. A review of chemical and microbial contamination in food: what are the threats to a circular food system? **Environmental Research**, Massachusetts, v. 194, p. 110635, Mar. 2021.

THE INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE PROPERTIES OF WATER AND STEAM. **Release on the IAPWS formulation 2008 for the viscosity of ordinary water substance**. Berlin: IAPWS, 2008. Disponível em: <http://www.iapws.org/relguide/viscosity.html>. Acesso em: 23 jun. 2023.

THEIN-HAN, W. W.; SAIKHUN, J.; PHOLPRAMOO, C.; MISRA, R. D. K.; KITIYANANT, Y. Chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering: physico-chemical properties and biological response of buffalo embryonic stem cells and transfectant of GFP–buffalo embryonic stem cells. **Acta Biomaterialia**, Amsterdam, v. 5, n. 9, p. 3453–3466, Nov. 2009.

THOMAS, A. B.; NASSUR, R. C. M. R.; VILAS BOAS, A. C.; LIMA, L. C. O. Cassava starch edible coating incorporated with propolis on bioactive compounds in strawberries. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 40, n. 1, p. 87-96, Jan/Fev. 2016.

TOMADONI, B. M.; PEREDA, M.; MOREIRA, M. D. R.; PONCE, A. G. Chitosan edible coatings with geraniol or vanillin: a study on fresh-cut strawberries microbial and sensory quality through refrigerated storage. **Food Science and Nutrition Technology**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 000178, May 2019.

TOSETTI, R.; ELMİ, F.; PRADAS, I.; COOLS, K.; TERRY, L. A. Continuous exposure to ethylene differentially affects senescence in receptacle and achene tissues in strawberry fruit. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 11, n. 174, p. 1-9, Mar. 2020.

TUDORACHE, M.; BORDENAVE, N. Phenolic compounds mediate aggregation of water-soluble polysaccharides and change their rheological properties: effect of different phenolic compounds. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 97, p. 105193, Jul. 2019.

TYLER, P.S. & GILMAN, G.A. L'évaluation des pertes post-récolte, Séminaire de Bamako, p. 137-151, 1979.

UHL, K. R.; FYHRİE, K. J.; BRODT, S. B.; MITCHELL, A. E. Blue Elderberry (*Sambucus nigra* ssp. *cerulea*): a robust and underutilized fruit for value-added products. **ACS Food Science and Technology**, Washington, v. 2, n. 2, p. 347-358, Jan. 2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. **Tabela brasileira de composição de alimentos** - TACO. 4. ed. rev. e ampl. Campinas: UNICAMP/NEPA, 2011. 161 p. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela>. Acesso em: 01 jul. 2023.

VARGAS, M.; PASTOR, C.; CHIRALT, A.; MCCLEMENTS, D.J.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Oxfordshire, v. 48, n.6, p.496-511, Jun. 2008.

VARGHESE, S. A.; PULIKKALPARAMBIL, H.; PROMHUAD, K.; SRISA, A.; LAORENZA, Y.; JARUPAN, L.; NAMPITCH, T.; CHONHENCHOB, V.; HARNKARNSUJARIT, N. Renovation of agro-waste for sustainable food packaging: a review. **Polymers**, Basel, v. 15, n. 3, p. 648, Jan. 2023.

VEBERIC, R.; JAKOPIC, J.; STAMPAR, F.; SCHMITZER, V. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. **Food Chemistry**, Oxfords, v. 114, n. 2, p. 511-515, May 2009.

VEIGA, S. C. P. **Estudos físico-químicos de N-acetilação de quitosanas em meio homogêneo**. Orientador: Sérgio Paulo Campana Filho. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

VIEIRA, V.; PRIETO, M. A.; BARROS, M.; COUTINHO, J. A. P.; FERREIRA, I. C. F. R.; FERREIRA, O. Enhanced extraction of phenolic compounds using choline chloride based deep eutectic solvents from *Juglans regia* L. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 115, p. 261-271, May 2018.

VIUDA-MARTOS, M.; FERNÁNDEZ-LOPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, New Jersey, v. 9, p. 635-654, Nov. 2010.

WANG, H.; QIAN, J.; DING, F. Emerging chitosan-based films for food packaging applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 66, p. 395-413, 2018.

WANG, S.; WANG, X.; YU, L. M.; SUN, M. L. Progress and trends of photodynamic therapy: from traditional photosensitizers to AIE-based photosensitizers. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 34, p. 102254, Jun. 2021.

WONG, Y. S.; YUSOFF, R.; NGOH, G. C. Phenolic compounds extraction by assistive technologies and natural deep eutectic solvents. **Reviews in Chemical Engineering**, Berlin, Mar. 2023.

WU, S. C.; YANG, Z.; LIU, F.; PENG, W.; QU, S.; LI, Q.; SONG, X.; ZHU, K.; SHEN, J. Antibacterial effect and mode of action of flavonoids from licorice against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, p. 1-14, Nov. 2019.

XIANG, Q.; LI, M.; WEN, J.; REN, F.; YANG, Z.; JIANG, X.; CHEN, Y. The bioactivity and applications of pomegranate peel extract: a review. **Journal of Food Biochemistry**, New Jersey, v. 46, n. 7, p. 14105, 2022.

XIE, Z. A.; LIANG, W. L.; XIONG, Q. Y.; ZHAO, Y. Y.; CHENG, J. L.; LI, X. B.; ZHAO, J. H. Acetalated dextran microparticles for the smart delivery of pyraclostrobin to control *Sclerotinia* diseases. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 291, p. 119576, Sep. 2022.

XING, Y.; XU, Q.; XINGCHEN, L.; CHEN, C.; MA, L.; LI, S.; CHE, Z.; LIN, H. Chitosan-based coating with antimicrobial agents: preparation, property, mechanism, and application effectiveness on fruits and vegetables. **International Journal of Polymer Science**, Cairo, p. 1-24, 2016.

YAN, J.; LUO, Z.; BAN, Z.; LU, H.; LI, D.; YANG, D.; AGHDAM, M. S.; LI, L. The effect of the layer-by-layer (LBL) edible coating on strawberry quality and metabolites during storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 147, p. 29-38, Jan. 2019.

YILDIRIM-YALÇIN, M.; ŞEKER, M.; SADIKOĞLU, H. Effect of grape derivatives and cross-linked maize starch coatings on the storage life of strawberry fruit. **Progress in Organic Coatings**, Amsterdam, v. 167, p. 106850, Jun. 2022.

YOO, D. E.; JEONG, K. M.; HAN, S. Y.; KIM, E. M.; JIN, Y.; LEE, J. Deep eutectic solvent-based valorization of spent coffee grounds. **Food Chemistry**, Oxford, v. 255, p. 357-364, Jul. 2018.

YU, J. S.; ZHANG, F.; ZHANG, J.; HAN, Q. M.; SONG, L. L.; MENG, X. H. Effect of photodynamic treatments on quality and antioxidant properties of fresh-cut potatoes. **Food Chemistry**, Oxford, v. 362, p. 130224, Nov. 2021.

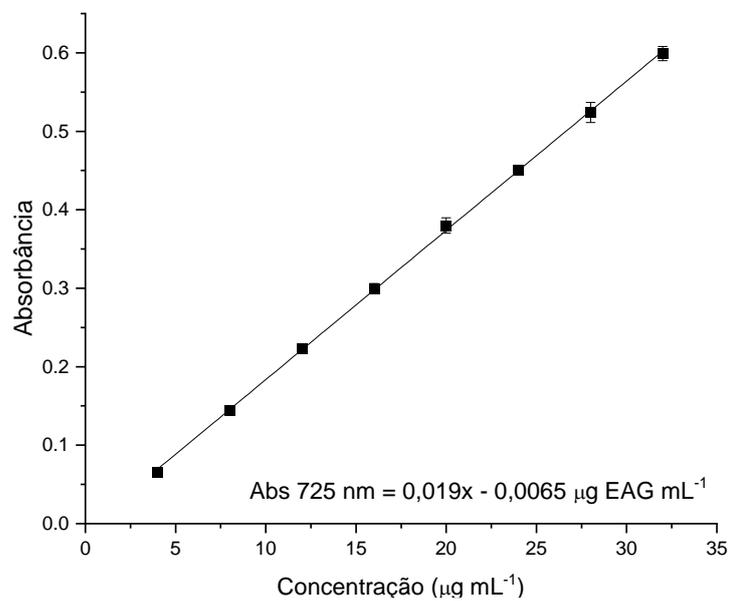
YU, Y. Y.; ZHANG, W.; CAO, S. W. Extraction of ferulic acid and caffeic acid with ionic liquids. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 35, p. 1726-1730, Dec. 2007.

YUAN, G.; LV, H.; TANG, W.; ZHANG, X.; SUN, H. Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage. **Food Control**, Amsterdam, v. 59, p. 818-823, Jan. 2016.

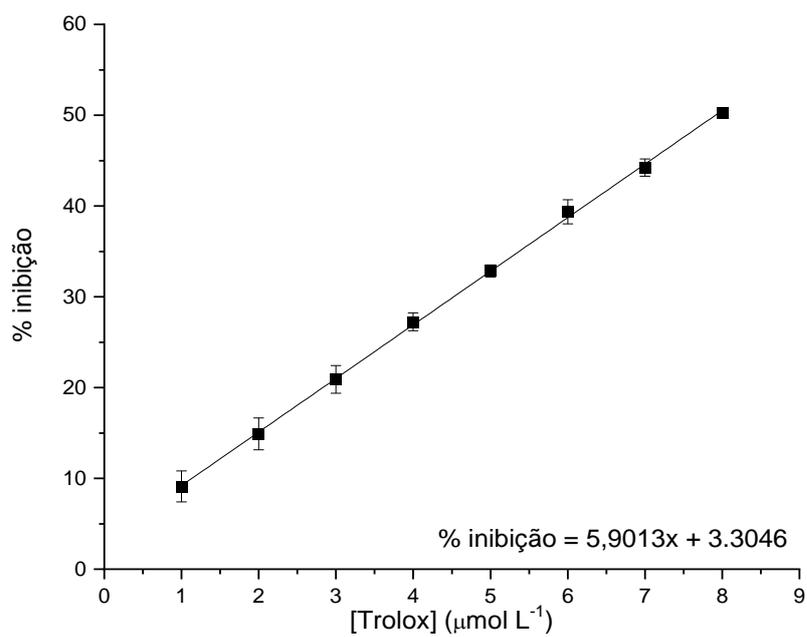
ZHANG, X.; WU, J.; XU, C. S.; LU, N.; GAO, Y.; XUE, Y.; LI, Z. J.; XUE, C. H.; TANG, Q. J. Inactivation of microbes on fruit surfaces using photodynamic therapy and its influence on the postharvest shelf-life of fruits. **Food Science and Technology International**, Thousand Oaks, v. 26, p. 696-705, May 2020.

APÊNDICES

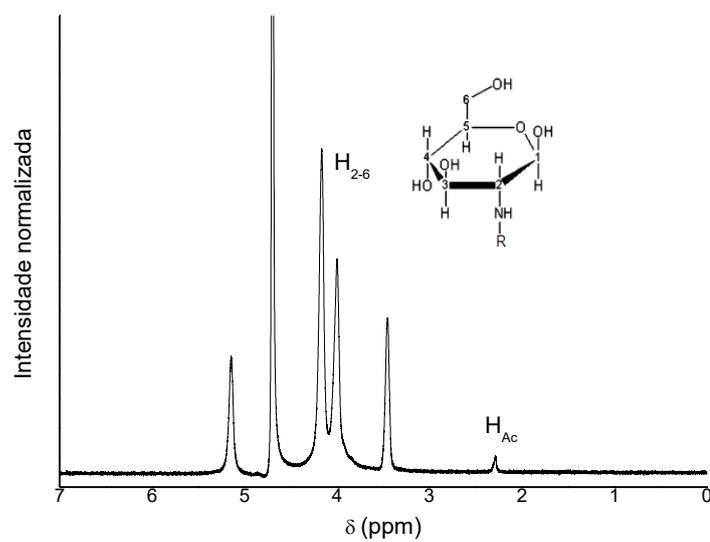
Figura A1. Curva de calibração de ácido gálico em água para o ensaio de Folin Ciocalteu ($R^2 = 0,9997$).



Fonte: autoria própria.

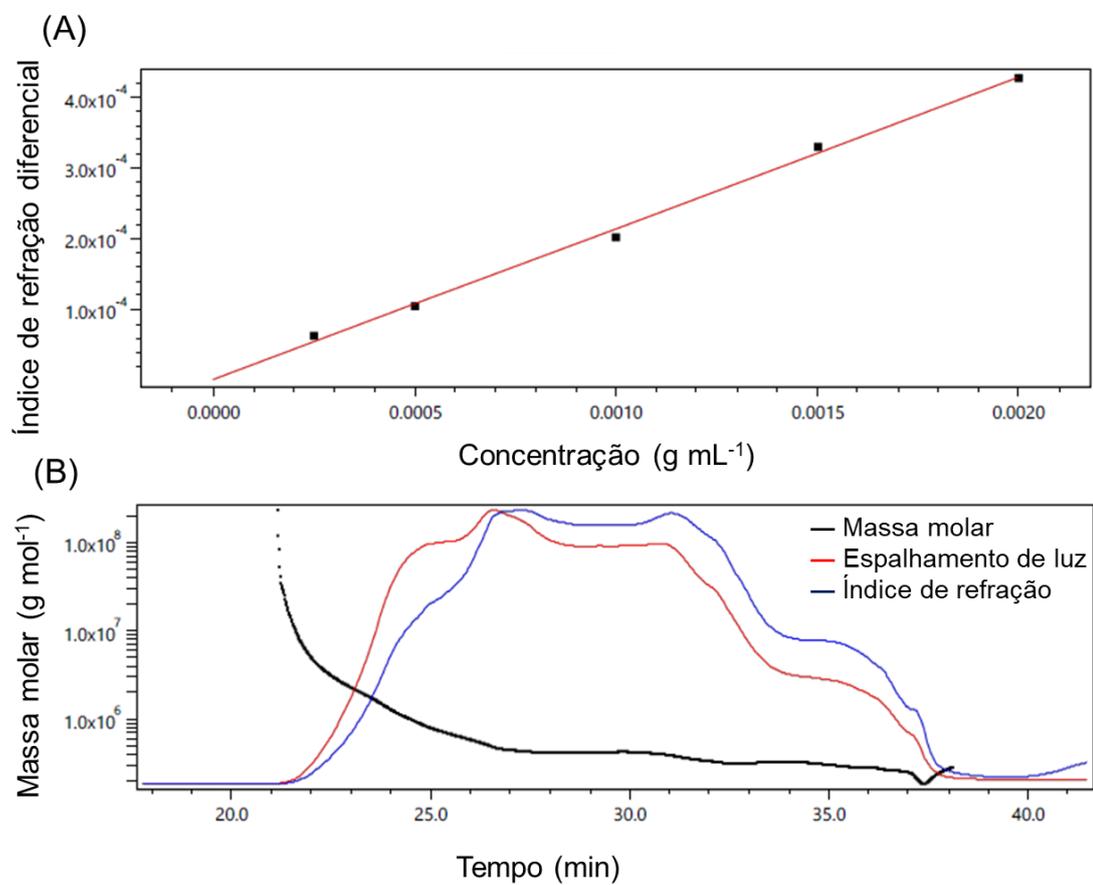
Figura A2. Curva de calibração de Trolox em etanol para o ensaio do radical ABTS ($R^2 = 0,9994$).

Fonte: autoria própria.

Figura A3. Espectro de RMN ^1H da quitosana preparada.

Fonte: autoria própria.

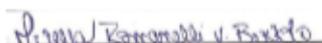
Figura A4. Gráfico de índice de refração diferencial versus concentração da amostra para a determinação do dn/dc da quitosana. (B) Cromatograma com a distribuição da massa molar da quitosana em função do tempo.



Fonte: autoria própria.

Figura A5. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Consumidores.**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) – Consumidores****Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

1. Você está sendo convidado para participar da pesquisa: QUÍMICA DO SABOR DE MORANGOS RECOBERTOS COM REVESTIMENTOS A BASE DE EXTRATO DE CASCA DE ROMÃ (*PUNICA GRANATUM* L.), QUITOSANA E GELATINA.
2. O presente projeto tem como objetivos avaliar o efeito de revestimentos comestíveis incorporados com extratos de casca de romã na qualidade física, físico-química e sensorial de morangos.
3. Você foi selecionado por gostar de morangos e sua participação não é obrigatória. Você disponibilizará em tomo de 5 a 10 minutos para realização do teste, que será realizado no Laboratório de Ensino do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP), durante uma aula da disciplina 7500061 - Análise Sensorial.
5. Considerando que toda pesquisa envolve riscos, para higienização das amostras foram tomadas providências de padrão de higiene. As amostras foram armazenadas em condições adequadas para o consumo seguro.
6. Você poderá desistir de fazer o teste sensorial no início ou no meio dos testes sem qualquer prejuízo.
7. Quanto aos benefícios da pesquisa, espera-se obter informações importantes o que se refere à qualidade do produto e com estes dados serão geradas discussões no tema de novas tecnologias pós-colheita de frutas e hortaliças. Para o julgador não há benefícios diretos.
8. A pesquisa não envolve ganhos ou gastos, mas se estes existirem, serão ressarcidos. Além disso, haverá indenização caso danos decorrentes da pesquisa ocorrerem.
9. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento.
10. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.
11. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação.
12. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação, nas publicações somente serão informados sexo e idade dos julgadores.
13. Não haverá despesas decorrentes da participação na pesquisa - teste sensorial.
14. Você ficará com uma cópia desta via onde consta o telefone e o endereço da pesquisadora responsável, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento



Mirella Romanelli Vicente Bertolo

Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo

Av. Trab. São Carlense, 400 - Parque Arnold Schmidt, São Carlos - SP, 13566-590 – (16) 981396313

mirella.bertolo@usp.br

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar. O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do CENTRO UNIVERSITÁRIO CENTRAL PAULISTA - UNICEP

Local e data

Sujeito da pesquisa

Figura A6. Ficha de avaliação utilizada pelos provadores durante o teste de análise sensorial.

TESTE DE DIFERENÇA DO CONTROLE - MORANGOS

Nome: _____ Data: _____

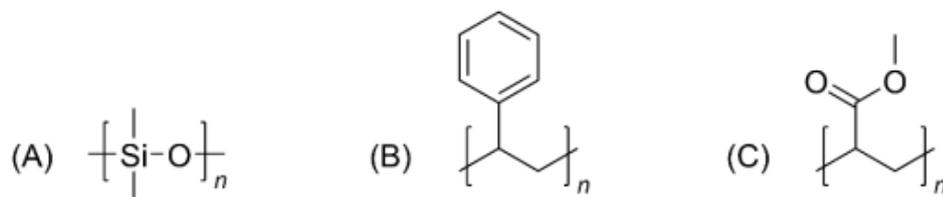
Você está recebendo uma amostra padrão (P) e 3 amostras codificadas (1, 2 e 3). Por favor, prove a amostra padrão e, em seguida, prove cada uma das amostras codificadas e avalie, de acordo com a escala abaixo, o quanto cada amostra codificada difere, em termos globais, da amostra padrão.

	Amostras
1. Extremamente melhor que P	_____
2. Muito melhor que P	_____
3. Moderadamente melhor que P	_____
4. Ligeiramente melhor que P	_____
5. Não há diferença entre P e a amostra	_____
6. Ligeiramente pior que P	_____
7. Moderadamente pior que P	_____
8. Muito pior que P	_____
9. Extremamente pior que P	_____

Comentários: _____

Fonte: autoria própria.

Figura A7. Estruturas químicas dos revestimentos das fibras de SPME utilizadas para a extração de compostos voláteis dos morangos: (A) PDMS, (B) DVB, (C) PA.



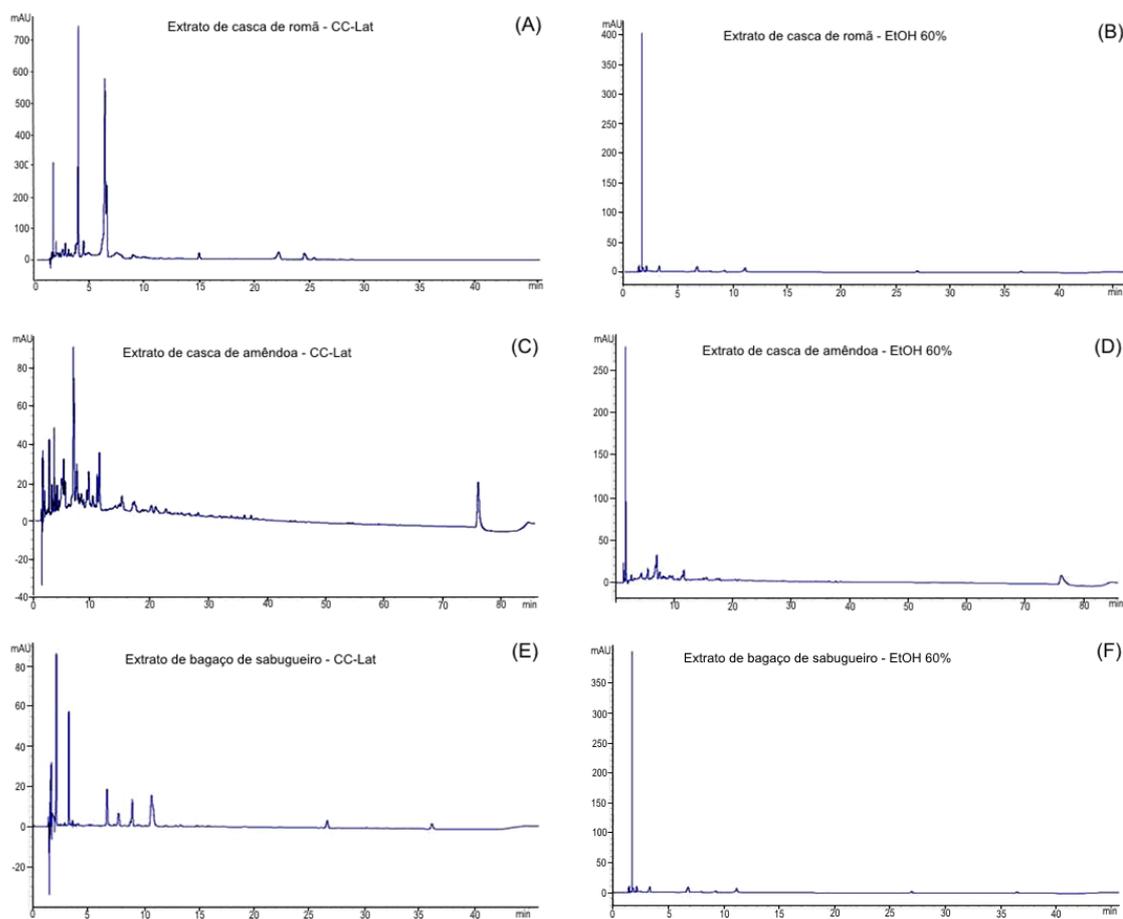
Fonte: adaptado de Marques (2021).

Figura A8. Cromatograma ilustrativo dos compostos voláteis extraídos dos morangos com a fibra DVB-CAR-PDMS.



Fonte: autoria própria.

Figura A9. Cromatogramas dos extratos de casca de romã (280 nm), casca de amêndoa (280 nm) e bagaço de sabugueiro (520 nm) obtidos com CC-LAT (A, C e E, respectivamente) e etanol 60% (v/v) (B, D e F, respectivamente), todos diluídos 1:8 em ácido fosfórico 1,5% (v/v).



Fonte: autoria própria.

Tabela A1. Parâmetros utilizados no cálculo da massa molar viscosimétrica da quitosana.

Replicata	$[\eta]$ (mL g ⁻¹)	R ²	K (mL mol g ⁻²)	α	M _v (g mol ⁻¹)
1	1917,5	0,999	0,075	0,809	2,81×10 ⁵
2	2081,3	0,999	0,075	0,809	3,11×10 ⁵
3	2054,5	0,999	0,075	0,809	3,06×10 ⁵
Média					3,00×10 ⁵

Fonte: autoria própria.

Apêndices

Tabela A2. Resultados da ANOVA para o DCCR conduzido para otimizar a composição das misturas de quitosana, gelatina e extrato de casca de romã quanto ao seu conteúdo total de fenólicos, viscosidade, solubilidade, opacidade e TPVA.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Médias quadráticas	F _{cal}	F _{tab}	F _{cal} /F _{tab}
Conteúdo total de fenólicos						
Regressão	1.50E+05	5	3.00E+04	13.21	4.39	3.01
Resíduo	1.36E+04	6	2.27E+03			
Falta de ajuste	1.23E+04	3	4.09E+03	9.01	9.28	0.97
Erro puro	1.36E+03	3	4.54E+02			
Total	1.64E+05	11				
R ²	0,91674					
Viscosidade						
Regressão	1.76E+02	5	3.52E+01	3.33	4.39	0.76
Resíduo	6.35E+01	6	1.06E+01			
Falta de ajuste	6.34E+01	3	2.11E+01	672.8 4	9.28	72.50
Erro puro	9.43E-02	3	3.14E-02			
Total	2.40E+02	11				
R ²	0,73518					
Solubilidade						
Regressão	3.69E+02	5	7.39E+01	1.29	4.39	0.29
Resíduo	3.42E+02	6	5.71E+01			
Falta de ajuste	3.41E+02	3	1.14E+02	220.9 9	9.28	23.81
Erro puro	1.54E+00	3	5.14E-01			
Total	7.12E+02	11				
R ²	0,51889					
Opacidade						
Regressão	5.88E+01	5	1.18E+01	4.64	4.39	1.06
Resíduo	1.52E+01	6	2.54E+00			
Falta de ajuste	1.46E+01	3	4.86E+00	22.95	9.28	2.47
Erro puro	6.35E-01	3	2.12E-01			
Total	7.40E+01	11				
R ²	0,79435					
TPVA						
Regressão	1.44E+00	5	2.88E-01	5.05	4.39	1.15
Resíduo	3.43E-01	6	5.71E-02			
Falta de ajuste	3.38E-01	3	1.13E-01	74.38	9.28	8.02
Erro puro	4.54E-03	3	1.52E-03			
Total	1.78E+00	11				
R ²	0,80796					

Fonte: autoria própria.

Tabela A3. Parâmetros físico-químicos da água a cada leitura de mortalidade dos peixe-zebra, para os três grupos analisados (controle, QGE 10, 50 e 100 mg L⁻¹, e QG 100 mg L⁻¹).

Tempo (h)	Concentração/grupos (mg L ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)
0	Controle	6.8 ± 0.30	25.4 ± 0.11	9.67 ± 0.39
	10 QGE	7.0 ± 0.05	25.4 ± 0.10	9.40 ± 0.40
	50 QGE	7.1 ± 0.10	25.5 ± 0.10	9.66 ± 0.26
	100 QGE	6.9 ± 0.06	25.4 ± 0.15	9.59 ± 0.26
	100 QG	7.0 ± 0.06	25.3 ± 0.10	9.75 ± 0.07
24	Controle	7.0 ± 0.15	25.4 ± 0.25	9.30 ± 0.95
	10 QGE	6.9 ± 0.15	25.3 ± 0.15	9.09 ± 0.56
	50 QGE	7.0 ± 0.10	25.4 ± 0.05	9.26 ± 0.88
	100 QGE	7.1 ± 0.15	25.3 ± 0.10	9.09 ± 0.38
	100 QG	7.2 ± 0.10	25.4 ± 0.25	9.84 ± 0.14
48	Controle	7.2 ± 0.05	25.8 ± 0.69	9.90 ± 0.31
	10 QGE	7.2 ± 0.05	25.3 ± 0.15	9.96 ± 0.22
	50 QGE	7.2 ± 0.12	25.3 ± 0.25	9.71 ± 0.74
	100 QGE	7.1 ± 0.11	25.2 ± 0.10	9.46 ± 0.32
	100 QG	7.2 ± 0.10	25.3 ± 0.10	9.65 ± 0.30
72	Controle	7.5 ± 0.15	24.3 ± 0.15	9.74 ± 0.13
	10 QGE	7.4 ± 0.15	24.5 ± 0.26	9.69 ± 0.97
	50 QGE	7.4 ± 0.17	24.6 ± 0.21	9.30 ± 0.48
	100 QGE	7.4 ± 0.10	25.1 ± 0.10	9.76 ± 0.48
	100 QG	7.3 ± 0.10	24.8 ± 0.11	9.81 ± 0.16
96	Controle	7.0 ± 0.05	24.8 ± 0.10	9.85 ± 0.43
	10 QGE	7.5 ± 0.05	24.8 ± 0.15	9.58 ± 0.31
	50 QGE	7.4 ± 0.06	24.9 ± 0.17	9.76 ± 0.45
	100 QGE	7.2 ± 0.10	25.0 ± 0.10	9.82 ± 0.34
	100 QG	7.2 ± 0.15	24.8 ± 0.20	9.64 ± 0.30

Fonte: autoria própria.

ANEXOS

Anexo I. Cópia da permissão do periódico Food Packaging and Shelf Life para a reprodução dos resultados do artigo “Central composite design optimization of active and physical properties of food packaging films based on chitosan/gelatin/pomegranate peel extract”.

Home Help Live Chat Mirella Bertolo



Central composite design optimization of active and physical properties of food packaging films based on chitosan/gelatin/pomegranate peel extract

Author:
Mirella Romanelli Vicente Bertolo, Lucas Danilo Dias, Josemar Gonçalves de Oliveira Filho, Fernanda Alves, Crisiane Aparecida Marangon, Virginia da Conceição Amaro Martins, Marcos David Ferreira, Vanderlei Salvador Bagnato, Ana Maria de Guzzi Plepis et al.

Publication: Food Packaging and Shelf Life

Publisher: Elsevier

Date: December 2022

© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

[BACK](#) [CLOSE WINDOW](#)

© 2023 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Data Security and Privacy | For California Residents | Terms and Conditions
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customer@copyright.com

Anexo II. Cópia do depósito do pedido de patente referente à invenção BR 10 2021 026404 (em destaque).

Patentes – RPI 2688 de 12 de Julho de 2022

282/1210

Código Depósito

Código 2.1 - Pedido de Patente ou Certificado de Adição de Invenção depositado

Pedido de Patente ou Certificado de adição de invenção protocolizado, O pedido será mantido em sigilo durante 18 (dezoito) meses a contar da data da prioridade mais antiga, Decorrido esse prazo, será publicado para conhecimento público, O depositante pode, porém, requerer a antecipação da publicação, O prazo de sigilo de 18 (dezoito) meses para o pedido de Certificado de Adição de Invenção é contado da data do depósito do pedido principal. Quando houver ocorrido a publicação do pedido principal, o pedido de Certificado de Adição de Invenção será imediatamente publicado, Os depósitos são designados de acordo com a natureza requerida: Invenção, Modelo de Utilidade e Certificado de Adição de Invenção, Os pedidos depositados através do PCT são notificados no subitem 1.1.

(21) BR 10 2021 022691-9	Código 2.1 - Pedido de Patente ou Certificado de Adição de Invenção depositado (22) 11/11/2021 (71) RENATA JESUINA TAKAHASHI (BR/SP)
(21) BR 10 2021 026404-7	Código 2.1 - Pedido de Patente ou Certificado de Adição de Invenção depositado (22) 23/12/2021 (71) UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP (BR/SP)
(21) BR 10 2021 026062-0	Código 2.1 - Pedido de Patente ou Certificado de Adição de Invenção depositado (22) 30/12/2021 (71) UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO - UFERSA (BR/RN)
(21) BR 10 2022 005505-3	Código 2.1 - Pedido de Patente ou Certificado de Adição de Invenção depositado (22) 24/03/2022 (71) NIVALDO MANTUAN JUNIOR (BR/SP)
(21) BR 10 2022 005574-2	Código 2.1 - Pedido de Patente ou Certificado de Adição de Invenção depositado (22) 24/03/2022 (71) SHANDONG WEIFANG RAINBOW CHEMICAL CO., LTD. (CN)
(21) BR 10 2022 006108-4	Código 2.1 - Pedido de Patente ou Certificado de Adição de Invenção

Anexo III. Cópia do parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) para a condução do teste de análise sensorial.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Efeito de revestimentos comestíveis com óleos essenciais nas propriedades sensoriais de frutas e hortaliças

Pesquisador: MARCOS DAVID FERREIRA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 28847220.0.0000.5380

Instituição Proponente: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA

Patrocinador Principal: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.257.420

Apresentação do Projeto:

Os revestimentos comestíveis são membranas ou películas formadas por biopolímeros como polissacarídeos, proteínas e lipídeos, que podem ser aplicadas ou diretamente formadas sobre a superfície das frutas, visando a extensão da sua vida de prateleira. Materiais a base de quitosana e gelatina têm mostrado melhorias nas propriedades mecânicas e nas propriedades de barreira ao vapor de água e a passagem de luz, e seu uso como revestimentos de alimentos vem crescendo nos últimos anos. Para a conferência ou melhoria das atividades ativas desses revestimentos, como a antioxidante e a antimicrobiana, propõe-se a inclusão de extratos de casca de romã (*Punica granatum* L.), ricos em compostos antioxidantes. O presente projeto se propõe a utilizar métodos sensoriais na pesquisa de revestimentos comestíveis com materiais a base de quitosana, gelatina e extrato de casca de romã. Os principais objetivos referem-se ao estudo da influência dos revestimentos comestíveis com e sem adição dos extratos vegetais da casca da romã sobre a vida de prateleira de frutas e hortaliças, principalmente de morangos. Os testes de análise sensorial serão conduzidos de acordo com a normativa (NBR 12994, 1993) da Associação Brasileira de Normas Técnicas, baseada na ISO 6658/1985 e com o Manual de Análise Sensorial da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. A população alvo da pesquisa sensorial será voluntária, sem remuneração, e recrutada por meio de questionários. Os materiais empregados no

Endereço: Rua Miguel Petroni, nº 5.111
Bairro: Jardim Centenário **CEP:** 13.563-470
UF: SP **Município:** SAO CARLOS
Telefone: (16)3362-2111 **Fax:** (16)3362-2111 **E-mail:** comitedeetica@unicep.com.br



Continuação do Parecer: 5.257.420

revestimento dos morangos não apresentam riscos à saúde, uma vez que serão elaborados de acordo com as Boas Práticas de Fabricação de alimentos; além disso, serão realizadas análises microbiológicas e de toxicidade prévias nos materiais e nos frutos, para garantir sua segurança.

Objetivo da Pesquisa:

Os principais objetivos dessa emenda referem-se ao estudo da influência dos revestimentos comestíveis (com materiais a base de quitosana e gelatina) com e sem adição dos extratos vegetais da casca da romã sobre a vida de prateleira de frutas e hortaliças, principalmente de morangos. Ressalta-se que são revestimentos e extratos (Óleos Essenciais) alinhados com o projeto de pesquisa previamente aprovado, mas não inseridos anteriormente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Toda pesquisa com seres humanos envolve risco em tipos e gradações variados. Mas, por se tratar da avaliação sensorial de produtos alimentícios, a probabilidade de desconfortos é muito reduzida e o riscos mínimos. Comumente os riscos prováveis infecções causadas por bactérias e suas toxinas, vírus e parasitas, alergias ou intolerância a algum dos componentes do alimento. Entretanto esses riscos são extremamente baixos, uma vez que os produtos serão elaborados segundo as Boas Práticas de Fabricação de alimentos, com todo o rigor sanitário exigido para a manipulação de alimentos e avaliados quanto à sua carga microbiana. No caso da presença de componentes alergênicos, estes serão previamente informados aos provedores. Outro ponto que será levado em consideração pelo líder do projeto será o risco mínimo de constrangimento ao responder um questionário, fazendo esclarecimentos prévios ao participante da pesquisa, bem como algum desconforto advindo da ingestão dos produtos avaliados nos experimentos. Esses riscos poderão ser minimizados pela garantia do sigilo de informações e imagens obtidas na pesquisa, pelo anonimato dos participantes, pelos avisos aos participantes de que há substâncias ou alimentos que possam causar alergia ou danos à saúde, como por exemplo, advertir portadores de diabetes da presença de açúcar no produto, de portadores de doença celíaca de glúten. Também será garantida

Endereço: Rua Miguel Petroni, nº 5.111
 Bairro: Jardim Centenário CEP: 13.563-470
 UF: SP Município: SAO CARLOS
 Telefone: (16)3362-2111 Fax: (16)3362-2111 E-mail: comitedeetica@unicep.com.br



Continuação do Parecer: 5.257.420

a segurança por meio de análises microbiológicas. No caso de desconforto ou mal estar, acompanhado de reações, como por engasgamento e vômito, será seguida a recomendação da Resolução 466/2012, quanto ao item IV.3 sub item b, no qual será solicitado a apresentação das providências e cautelas a serem empregadas para evitar e reduzir efeitos e condições adversas que possam causar dano, considerando características e contexto do participante da pesquisa. Contudo se ocorrer algum desconforto durante ou até 12 h após a análise, o provador receberá assistência médica integral e gratuita, pelo tempo que for necessário. Os provadores serão informados dos objetivos de cada projeto, e no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) será explicitado o benefício que cada estudo trará para o avanço do conhecimento científico e tecnológico, para o desenvolvimento socioeconômico dos agentes envolvidos na cadeia produtiva em questão e para a sociedade como um todo.

Benefícios:

Os benefícios para os avaliadores referem-se a possibilidade de contribuir para uma pesquisa com o objetivo de melhorar o sistema de conservação de frutas e hortaliças no Brasil, utilizando produtos (GRAS) e também auxiliando a redução de perdas pós-colheita em alimentos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

Recomendações:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A emenda apresentada está de acordo ao projeto original ao qual encontra-se adequado e aprovado, de acordo com o Relator, o Colegiado e com a Resolução 466/12. Qualquer alteração que venha ocorrer, pedimos a gentileza de informar este CEP por meio de Emenda e/o Notificação junto a Plataforma Brasil. O pesquisador deve se comprometer a enviar Relatório Parcial e, após a conclusão do mesmo solicitamos o encaminhamento do Relatório Final, procedimento de cunho obrigatório.

Endereço: Rua Miguel Petroni, nº 5.111
 Bairro: Jardim Centenário CEP: 13.563-470
 UF: SP Município: SAO CARLOS
 Telefone: (16)3382-2111 Fax: (16)3382-2111 E-mail: comitedeetica@unicep.com.br



Continuação do Parecer: 5.257.420

No Relatório Final solicita-se a descrição do Processo de obtenção do TCLE, descrição do número de participantes que concordaram em participar da pesquisa e quantos foram excluídos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_188103_5_E1.pdf	04/01/2022 15:27:50		Aceito
Outros	Emenda.pdf	04/01/2022 15:15:04	MARCOS DAVID FERREIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_Sensorial.pdf	08/02/2020 11:35:38	MARCOS DAVID FERREIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO.pdf	31/01/2020 08:50:07	MARCOS DAVID FERREIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Sensorial_2020.pdf	31/01/2020 08:48:40	MARCOS DAVID FERREIRA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_CEP.pdf	31/01/2020 08:23:12	MARCOS DAVID FERREIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO CARLOS, 22 de Fevereiro de 2022

Assinado por:

Cintia Alessandra Matiucci Pereira
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Miguel Petroni, nº 5.111
 Bairro: Jardim Centenário CEP: 13.563-470
 UF: SP Município: SAO CARLOS
 Telefone: (16)3362-2111 Fax: (16)3362-2111 E-mail: comitedeetica@unicep.com.br

Anexo IV. Cópia da permissão do periódico International Journal of Biological Macromolecules para a reprodução dos resultados do artigo “Photoantimicrobial chitosan-gelatin-pomegranate peel extract films for strawberries preservation: From microbiological analysis to in vivo safety assessment”.

[Sign In/Register](#)

Photoantimicrobial chitosan-gelatin-pomegranate peel extract films for strawberries preservation: From microbiological analysis to in vivo safety assessment

Author:

Mirella R.V. Bertolo, Lucas D. Dias, Alessandra R. Lima, Antonio S.N. Aguiar, Fernanda Alves, Mariana de Souza, Hamilton B. Napolitano, Vanderlei S. Bagnato, Stanislaw Bogusz Junior

Publication: International Journal of Biological Macromolecules

Publisher: Elsevier

Date: 31 December 2023

© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)

Anexo V. Cópia do certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais para a condução dos ensaios *in vivo* com peixe-zebra.



USP UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO
Instituto de Física de São Carlos

**COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de polímeros fotossensíveis na fotoinativação de microrganismos: aplicação na descontaminação de dispositivos médicos e alimentos", protocolada sob o CEUA nº 2952290621, sob a responsabilidade de **Lucas Danilo Dias** e equipe; Alessandra Ramos Lima; Mirella Romanelli Vicente Bertolo; Stanislaw Bogusz Junior; Vanderlei Salvador Bagnato - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo (CEUA/IFSC) na reunião de 05/08/2021.

We certify that the proposal "Evaluation of photosensitive polymers for photoinactivation of microorganisms: application in the decontamination of medical devices and foods", utilizing 729 Fishes (males and females), protocol number CEUA 2952290621, under the responsibility of **Lucas Danilo Dias** and team; Alessandra Ramos Lima; Mirella Romanelli Vicente Bertolo; Stanislaw Bogusz Junior; Vanderlei Salvador Bagnato - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Physics Institute of São Carlos - São Paulo University (CEUA/IFSC) in the meeting of 08/05/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **08/2021 a 07/2023** Área: **Grupo de Óptica / Fcm**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Peixes** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **60 a 90 dias** N: **729**

Linhagem: **Danio rerio** Peso: **1 a 3 g**

Local do experimento: Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos (USP)

São Carlos, 23 de agosto de 2021

Prof. Dr. Fernando Fernandes Paiva
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo

Anexo VI. Cópia da permissão do periódico ACS Food Science and Technology para a reprodução dos resultados do artigo “Green strategies for recovery of bioactive phenolic compounds from agro-industrial wastes (pomegranate peels, almond hulls, and elderberry pomace) using natural deep eutectic solvents”.

[Sign in/Register](#)

Green Strategies for Recovery of Bioactive Phenolic Compounds from Agro-Industrial Wastes (Pomegranate Peels, Almond Hulls, and Elderberry Pomace) Using Natural Deep Eutectic Solvents



Author: Mirella R. V. Bertolo, Stanislaw Bogusz Junior, Alyson E. Mitchell

Publication: ACS Food Science & Technology

Publisher: American Chemical Society

Date: Nov 1, 2023

Copyright © 2023, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)