



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

JORGE ANDRES DUARTE DUARTE

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE DERIVADOS VEGETAIS PARA O
CONTROLE DE FUNGOS FITOPATÓGENOS DE INTERESSE AGROALIMENTAR

Tese de Doutorado submetida à
Universidade Federal Fluminense visando à obtenção do grau de
Doutor em Ciências e Biotecnologia

Orientadores: Prof. Dr. Leandro Machado Rocha

Profa. Dra. Sorele Batista Fiaux



Niterói, Rio de Janeiro, Brasil

Agosto de 2024

JORGE ANDRES DUARTE DUARTE

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE DERIVADOS VEGETAIS PARA O
CONTROLE DE FUNGOS FITOPATÓGENOS DE INTERESSE AGROALIMENTAR**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Tecnologia Microbiana (LTM) e no Laboratório de Produtos Naturais (LTPN) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense e no Laboratório de Inovação em Alimentos (LINA) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para o Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia da Universidade Federal Fluminense.

Apoio Financeiro: CAPES, UFF, UNICAMP, FAPESP

Tese de Doutorado submetida à Universidade Federal Fluminense como requisito parcial visando a obtenção do grau de Doutor em Ciências e Biotecnologia.

Orientadores: Prof. Dr. Leandro Machado Rocha

Profa. Dra. Sorele Batista Fiaux

Ficha catalográfica automática - SDC/BCV
Gerada com informações fornecidas pelo autor

D812a Duarte, Jorge Andres Duarte
Avaliação do potencial biotecnológico de derivados vegetais para o controle de fungos fitopatógenos de interesse agroalimentar / Jorge Andres Duarte Duarte. - 2024.
248 f.: il.

Orientador: Leandro Machado Rocha.
Coorientador: Sorele Batista Fiaux.
Tese (doutorado)-Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Niterói, 2024.

1. Atividade antifúngica. 2. Estratégias de biotecnologia. 3. Controle fitossanitário. 4. Tecnologia alimentaria. 5. Produção intelectual. I. Rocha, Leandro Machado, orientador. II. Fiaux, Sorele Batista, coorientadora. III. Universidade Federal Fluminense. Instituto de Biologia. IV. Título.

CDD - XXX

Bibliotecário responsável: Debora do Nascimento - CRB7/6368

JORGE ANDRES DUARTE DUARTE

Tese de Doutorado submetida à Universidade Federal Fluminense como requisito parcial visando a obtenção do grau de Doutor em Ciências e Biotecnologia.

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente:
 **SORELE BATISTA FIAUX**
Data: 28/08/2024 20:27:53 -0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. Sorele Batista Fiaux
Departamento de Tecnologia Farmacêutica
Universidade Federal Fluminense
(Presidente, co-orientadora)

Documento assinado digitalmente:
 **VANESSA MARTINS DA SILVA**
Data: 28/08/2024 09:32:48 -0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. Vanessa Martins da Silva
Departamento de Engenharia e Tecnologia
de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas
(Examinadora titular externa)

Documento assinado digitalmente:
 **MARIANA TEIXEIRA DA COSTA MACHADO**
Data: 28/08/2024 16:04:11-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. Mariana Teixeira da Costa Machado
Departamento de Tecnologia de Alimentos
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
(Examinadora titular externa)

Dra. Gabrielle Alves Ribeiro da Silva
Departamento de Bioquímica
Universidade do Estado do Rio de Janeiro
(Examinadora suplente externa)

Documento assinado digitalmente:
 **MAURICIO AFONSO VERICIMO**
Data: 28/08/2024 18:58:58-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

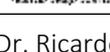
Dr. Mauricio Afonso Vericimo
Departamento de Imunobiologia
Universidade Federal Fluminense
(Examinador titular interno)

Documento assinado digitalmente:
 **MONICA PINTO MAIA**
Data: 29/08/2024 10:14:33-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. Mônica Pinto Maia
Departamento de Engenharia Química
e Petróleo
Universidade Federal Fluminense
(Examinadora titular interna)

Documento assinado digitalmente:
 **BETTINA MONIKA RUPPELT**
Data: 05/09/2024 10:18:33 -0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. Bettina Mônica Ruppelt
Departamento de Tecnologia Farmacêutica
Universidade Federal Fluminense
(Examinadora titular interna)

Documento assinado digitalmente:
 **RICARDO DIEGO DE ALBUQUERQUE**
Data: 2024.08.28 20:40:55 -0300

Dr. Ricardo Diego de Albuquerque
Departamento de Farmacotecnia
Universidade Nacional de Trujillo (Perú)
(Revisor – Examinador suplente externo)

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

Josué 1:9

Esta obra está dedicada a mi abuela Luz Marina Duarte, que me inspiró con su amor, bondad y espíritu de servicio hasta sus últimos días en este mundo. Ella siempre creyó que algún día realizaría este sueño y, desde la distancia, oraba y me animaba a no desfallecer.

Dedico también este trabajo a mi madre Cecília Rosa Duarte, por haber luchado incansablemente por mí en medio de tantas necesidades, por haberme dado el privilegio de estudiar y por apoyarme en la consecución de tantas metas que, para muchos, eran una simple ilusión. Eternamente agradecido. ¡Lo logramos!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela infinita misericórdia, fidelidade e cuidado durante tudo o período de formação no Brasil.

À toda a minha família por tudo o apoio e o ânimo brindado durante este tempo desde a distância, especialmente a minha querida mãe Cecília Rosa Duarte e a minha tia Yulied Duarte. Agradeço também as orações, os conselhos e o incentivo que minha avó Luz Marina me deu durante os primeiros anos do doutorado, o que me ajudou a nunca desistir de meu objetivo.

A meu orientador, o Prof. Dr. Leandro Rocha pela orientação, paciência e oportunidade de aprendizado durante o tempo de doutoramento.

À minha co-orientadora, a Profa. Dra. Sorele Batista Fiaux por todo o empenho, dedicação e apoio incondicional em sua orientação durante minha formação no Brasil. Muito obrigado por compartilhar sua experiência e conhecimentos como professora e pesquisadora, bem como por me estimular a ser melhor a cada dia. Sou grato por todo o apreço, suporte e paciência durante todo o meu doutorado, onde superamos obstáculos e contratempos. Foi uma grande honra ter aprendido e trabalhado com você.

Aos membros da equipe de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Microbiana (LTM) da Faculdade de Farmácia (FF) da UFF, especialmente ao Ozêias dos Santos, Daniele Blanc, Sandra Bettancour, Frederico Madeiros, Profa. Yanina Calvete, Profa. Monica Maia e Profa. Edlene Ribeiro, Camila Toledo, Bianca Nascimento, Ana Almeida e Lucas Correa por todas as contribuições, amizade, risadas, almoços, convivência e apoio durante os últimos anos de estudo. Foi um grande orgulho fazer parte desse laboratório que foi minha casa e minha família durante anos no Brasil.

Um agradecimento especial à Nathalia Amarante, formanda de Engenharia agrícola e ambiental, e à Victoria Marques e Gabriel Cunha dos Santos, formandos de Farmácia da UFF, cujo empenho e dedicação durante a iniciação tecnológica contribuíram muito para este projeto. Foi um período de muito trabalho, exigência e grande aprendizado que deixou excelentes lembranças e boas amizades.

Agradeço a equipe do Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais (LTPN) da Faculdade de Farmácia (UFF), em especial à Profa. Dra. Bettina Monika Ruppelt, por sua amizade, incentivo, e exemplo de vida. Obrigado por compartilhar toda a sua experiência e sabedoria em docência, pesquisa e extensão social. Agradeço também a Valéria Viana, Eunice Barbosa e ao Diogo Folly por toda a amizade e suas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimentos especiais à Me. Débora Eiriz, servidora da Central Analítica da Faculdade de Farmácia (UFF) por toda sua disposição, apoio e o conhecimento compartilhado para que este trabalho fosse possível. Muito obrigado por todo o carinho e a parceria. Adorei aprender coisas novas no mundo da química com uma grande pesquisadora de alto nível como você!

Gostaria de agradecer o apoio do Prof. Fabio, Philipe, Julia do Laboratório de Biologia Molecular (LURA/UFF). Ao Prof. Dr. Geraldo Renato de Paula e à Profa. Dra. Francislene pela amizade e por ter aberto as portas do Laboratório de Controle de Microbiologia (FF/UFF). Agradeço também o apoio do Prof. Dr. Mauricio Vericimo por ser solícito e emprestar as instalações de seu laboratório para o desenvolvimento deste projeto. A professora Sabrina Calil Eliás por ceder o uso da sala de microscopia (FF/UFF).

Gostaria também de agradecer à Professora Dra. Ana Silvia Prata por toda sua dedicação, magnífica orientação e apoio no desenvolvimento da fase final da pesquisa no Laboratório de Inovação de Alimentos (LINA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Muito obrigado a toda equipe de pesquisa do LINA por toda a contribuição e amizade, em especial ao Prof. Douglas Barbin, Patrícia Cardoso, Leonardo Tombones, Matheus Alves Ferreira, Fernanda Sviech, Lusimar Madeiros, Renann Lopes, Mariana Silveira, Luis Gustavo Dos Santos e Raúl Nascimento. Também agradeço o apoio e a parceria do Tiago Montenegro, formando de Eng. de Alimentos (FEA/UNICAMP) durante sua iniciação científica. Agradeço o apoio científico da Maria Clara Guimarães no desenvolvimento dos ensaios de bancada. Sou grato pela amizade e parceria do Arnaud Jacques Molle, doctorando da Università degli studi di Parma (Italia).

Também gostaria de agradecer à Profa. Dra. Liliana Rocha, do Laboratório de Microbiologia de Alimentos I da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, por abrir as portas de seu laboratório e fornecer todas as ferramentas necessárias para o desenvolvimento dos ensaios microbiológicos. Também gostaria de agradecer o apoio, a parceria incondicional e as longas noites de trabalho aos doutorandos Naara Aparecida Almeida e Daniel Lucino Silva dos Santos da FEA/UNICAMP.

Agradeço à Dra. Vanessa Martins da Silva, do Laboratório de Engenharia de Processos (LEP), por todo o apoio técnico e científico durante os diferentes testes de caracterização físico-química e mecânica de emulsões e revestimentos. A Orlando Célio Campovilla, do Laboratório de Leite da FEA/UNICAMP, pelo apoio nos estudos de potencial zeta.

Agradecimentos especiais à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio técnico por meio dos projetos FAPESP-2019/03812-2, FAPESP-2004/08517-3, FAPESP-2004/08517-3 e EMU 2009/54137-1.

Agradeço ao Pedro Toledo, ao Prof. Dr. Eugenio Oliveira, ao Javier Mantilla e ao Prof. Dr. João Leite por toda a parceria científica e pela excelente recepção em seus laboratórios na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Meus mais sinceros agradecimentos à Profa. Dra. Andrea Cardoso e Profa. Dra. Claudia Boian da Universidade Federal do ABC (UFABC) por todo o apoio e incentivo na minha formação acadêmica e por me ajudarem e me derem a oportunidade de sonhar com o mundo da ciência. Agradeço também às minhas orientadoras, Professoras Maria Angélica Costa e Marilce Pacheco, por todo o incentivo e apoio para continuar a crescer e realizar esse sonho que um dia planejamos. Muito obrigado a vocês!

Agradeço a parceria e o apoio acadêmico da Profa. Dra. Clemencia Lopez, da Universidade de Teramo (UNITE - Itália), e sua contribuição para a elaboração de algumas fases deste projeto de pesquisa.

Sou profundamente grato por todo o carinho, incentivo e ajuda que recebi de minha querida família brasileira, a família Fingola. Caio, Carol, Yasmin e Jucinea, muito obrigado por toda a amizade e apoio que vocês me deram durante todos esses anos. Vocês foram realmente um presente em minha vida. Agradeço também a Deus por ter conhecido o Sr. Fernando Fingola, uma pessoa que, apesar de não estar mais entre nós, deixou tantos bons ensinamentos e seu exemplo de serviço à família, à ciência e a Deus.

Agradeço aos meus colegas de curso Fernanda Silva, Hosana Marques, Jenifer Frouche e Jônatas Rolando por todo o apoio e a parceria durante as disciplinas do programa. Agradeço também

ao Damian Rodriguez, Gabriel Breder, Natália Rodrigues, Matheus Correa, Charlie Gomés, Juliane Castilho, Luis Ullmann, Isaías Amado, Daniel Carvalho e Helen Alcantara por sua valiosa amizade durante minha permanência no Brasil.

Muito obrigado aos Doutores Vanessa Martins da Silva, Mariana Teixeira da Costa Machado, Monica Pinto Maia, Bettina M. Ruppelt, Mauricio Afonso Verissimo, Ricardo Diego Albuquerque e Gabriela Alves Ribeiro por seu tempo e por suas contribuições científicas de alta qualidade para este trabalho de doutorado.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Biotecnologia (PPBI) do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense e ao seu corpo docente e de pesquisa que contribuem grandemente na minha formação acadêmica. Agradeço de forma especial à gestão acadêmica da Profa. Dra. Helena Carla Castro, do Prof. Dr. Marcelo Salabert e da Profa. Dra. Evelize Folly, que possibilitaram a manutenção da minha bolsa de estudos no país. Também sou grato pelo apoio e prestatividade da secretária do programa, a Me. Ana Lafet durante meu período no PPBI.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo de doutorado.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xviii
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. O IMPACTO DE PATÓGENOS NA PRODUÇÃO AGRÍCOLA.....	4
2.1.1. IMPORTÂNCIA E LIMITAÇÕES DA CULTURA DA BANANA.....	5
2.1.1.1. <i>Thielaviopsis ethacetica</i>	7
2.1.2. CARACTERÍSTICAS E LIMITAÇÕES DA CULTURA DO TOMATE.....	9
2.1.2.1. <i>Alternaria alternata</i>	10
2.2. PROBLEMAS no CONTROLE FITOSSANITÁRIO CONVENCIONAL.....	12
2.3. BIOPRODUTOS COMO AGENTES ALTERNATIVOS.....	14
2.4. RIQUEZA VEGETAL COMO FONTE DE SOLUÇÃO.....	15
2.4.1. ÓLEOS ESSENCIAIS.....	15
2.4.1.1. Técnicas de obtenção de óleos essenciais.....	16
2.4.1.2. Métodos de caracterização química dos óleos essenciais.....	17
2.5. BIOPROSPECÇÃO ANTIFÚNGICA DE MATERIAL VEGETAL PROCEDENTE DO BRASIL.....	17
2.5.1. ESPÉCIES VEGETAIS NATIVAS DO BRASIL.....	18
2.5.1.1. <i>Annona acutiflora</i>	18
2.5.1.2. <i>Xylopiya ochrantha</i>	19
2.5.2. BIOPROSPECÇÃO ANTIFÚNGICA DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS.....	20
2.5.3. BIOPROSPECÇÃO ANTIFÚNGICA DE UMA ERVA AROMÁTICA.....	21
2.6. BIOTECNOLOGIAS APLICADAS A BIOPRODUTOS.....	24
2.6.1. EMULSIFICAÇÃO.....	24
2.6.1.1. Análises de caracterização de nanoemulsão.....	26
2.6.1.2. Emulsificação aplicada ao estudo de bioantifúngicos agrícolas.....	27
2.6.2. MICROENCAPSULAÇÃO.....	28
2.6.2.1. Coacervação complexa.....	29
2.6.2.2. Biomateriais para encapsulação.....	33
2.6.2.2.1. Alginato.....	34
2.6.2.2.2. Gelatina.....	36
2.6.3. REVESTIMENTOS DE FRUTOS.....	36
2.6.3.1. Fécula de mandioca.....	38
2.7. ENSAIOS DE AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS VEGETAIS.....	39
2.7.1. ENSAIOS ANTIFUNGICOS <i>IN VITRO</i>	39
2.8. ASPECTOS DE QUALIDADE DE FRUTOS.....	40
2.8.1. PERDA DE PESO FISIOLÓGICA.....	42

2.8.2. COR INSTRUMENTAL.....	42
2.8.3. FIRMEZA.....	43
2.8.4. ACIDEZ E pH	44
2.8.5. SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS	45
3. PRESSUPOSTOS E PROBLEMA DE ESTUDO.....	46
4. JUSTIFICATIVA	48
5. OBJETIVOS	51
5.1. OBJETIVO GERAL	51
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
6.1. METODOLOGIA DO ESTUDO 1	54
6.1.1. ETAPA FITOQUÍMICA.....	55
6.1.1.1. Material vegetal.....	55
6.1.1.2. Obtenção de óleos essenciais.....	55
6.1.1.3. Caracterização química dos óleos essenciais.....	56
6.1.2. ETAPA DE VARREDURA ANTIFUNGICA	56
6.1.2.1. Obtenção do estoque da cultura pura.....	56
6.1.2.2. Varredura antifúngica preliminar	57
6.1.3. ETAPA DE NANOEMULSIFICAÇÃO PELO MÉTODO DE BAIXO APORTE DE ENERGIA..	58
6.2.3.1. Formulação da nanoemulsificação	58
6.1.3.2. Caracterização das nanoemulsões.....	59
6.1.3.3. Avaliação antifúngica in vitro de nanoformulações.....	59
6.1.4. ETAPA DE EMULSIFICAÇÃO POR TECNICA DE ALTO APORTE ENERGETICO.....	59
6.1.4.1. Emulsificação combinada	59
6.1.4.2. Caracterização físico-química das emulsões.....	60
6.1.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA DE EMULSÕES.....	60
6.1.5.1. Preparo do inóculo	60
6.1.5.2. Teste de microdiluição padronizado.....	60
6.1.5.3. Teste micelial.....	61
6.1.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DAS EMULSÕES SOBRE A ESTOCAGEM DE BANANAS...	61
6.1.6.1. Acondicionamento das bananas.....	61
6.1.6.2. Ensaio de microbiota	62
6.1.6.3. Ensaio de vida de prateleira.....	63
6.1.6.3.1. Aplicação dos tratamentos emulsificados nas bananas	63
6.1.6.3.2. Determinação da cor instrumental	63
6.1.6.3.3. Teste mecânico de textura em bananas.....	64
6.1.6.3.4. Sólidos solúveis totais.....	65
6.1.6.3.5. Potencial hidrogeniônico.....	65
6.1.6.3.6. Acidez titulável	65
6.2. METODOLOGIA DO ESTUDO 2	66
6.2.1. ETAPA FITOQUÍMICA.....	67
6.2.1.1. Recepção do óleo essencial	67
6.2.1.2. Caracterização química do óleo essencial de <i>C. citratus</i>	67

6.2.2. TESTE DE ATIVIDADE ANTIFUNGICA SOBRE O PATÓGENO DA PINTA PRETA	67
6.2.2.1. Preparo do inoculo de <i>A. alternata</i>	67
6.2.2.2. Ensaio de microdiluição do óleo essencial de <i>C. citratus</i>	68
6.2.3. ETAPA DE SCREENING POLIMERICA POR COACERVAÇÃO COMPLEXA	68
6.2.3.1. Materiais e reagentes	68
6.2.3.2. Distribuição de cargas.....	69
6.2.3.3. Varredura polimérica para coacervação complexa.....	69
6.2.3.4. Determinação da estequiometria adequada entre os polímeros	72
6.2.3.5. Formulação de micropartículas por coacervação complexa.....	72
6.2.3.6. Determinação da eficiência de coacervação	73
6.2.3.7. Caracterização morfológica das micropartículas e a verificação qualitativa de encapsulação	74
6.2.3.8. Tamanho das partículas e a distribuição de tamanho	74
6.2.3.9. Determinação do potencial fungistático e fungicida do óleo livre e encapsulado.....	75
6.2.4. ETAPA DE DESENVOLVIMENTO DE RECOBRIMENTOS COMESTÍVEIS	75
6.2.4.1. Preparação do revestimento	75
6.2.4.2. Ensaio da uniformidade do revestimento	76
6.2.4.3. Caracterização físico-química dos revestimentos.....	76
6.2.4.3.1. Tamanho da partícula.....	77
6.2.4.3.2. pH.....	77
6.2.4.3.3. Viscosidade.....	77
6.2.4.3.4. Densidade relativa.....	77
6.2.5. ETAPA DE ENSAIOS <i>IN SITU</i>	78
6.2.5.1. Seleção e acondicionamento de frutos	78
6.2.5.2. Ensaio antifúngico artificial em tomates.....	78
6.2.5.2.1. Aplicação dos revestimentos.....	79
6.2.5.2.2. Ensaio de contaminação artificial em frutos	79
6.2.5.3. Ensaio de vida de prateleira de tomates revestidos	80
6.2.5.3.1. Análise instrumental de cor nos tomates.....	81
6.2.5.3.2. Perda de peso do tomate	81
6.2.5.3.3. Avaliação da textura nos tomates	81
6.2.5.3.4. Análises de sólidos solúveis totais	82
6.2.5.3.5. Medições de pH	82
6.2.5.3.6. Análises de acidez triturável.....	82
6.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	82
6.4. CONSIDERAÇÕES SOBRE ASPECTOS ÉTICOS E/ OU GESTÃO DO PATRIMÔNIO	83
7. RESULTADOS	84
7.1. RESULTADOS DO ESTUDO 1	84
7.1.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS.....	84
7.1.2. CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES ELABORADAS PELO MÉTODO DE BAIXO APORTE DE ENERGIA	85
7.1.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS EMULSÕES ELABORADAS PELO MÉTODO DE ALTO APORTE ENERGÉTICO	89

7.1.5. ATIVIDADE FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA DAS EMULSÕES	90
7.1.6. EFEITO DAS EMULSÕES SOBRE O MICÉLIO DO FITOPATÓGENO.....	92
7.1.7. EFEITO DAS EMULSÕES BIOATIVAS SOBRE A MICROBIOTA DE BANANAS	93
7.1.8. EFEITO DAS EMULSÕES EM BANANAS TRATADAS DURANTE ARMAZENAMENTO... 94	
7.1.8.1. Monitoramento da cor das bananas.....	94
7.1.8.2. Análises da textura das bananas.....	95
7.1.8.3. Análises de sólidos solúveis totais em bananas.....	97
7.1.8.4. Análise de pH em bananas durante armazenamento.....	97
7.1.8.5. Análise da acidez titulável em polpa de bananas durante armazenamento.....	98
7.1.8.6. Identificação do índice de maturidade da polpa de banana.....	99
7.2. RESULTADOS DO ESTUDO 2	100
7.2.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. citratus</i>	100
7.2.2. ESTUDO DE MICROENCAPSULAÇÃO	101
7.2.2.1. Distribuição de cargas dos biopolímeros	101
7.2.2.2. Testes experimentais de coacervação complexa.....	102
7.2.2.3. Avaliação da estequiometria do par polimérico ideal.....	110
7.2.2.4. Caracterização do processo de coacervação	111
7.2.2.5. Caracterização do tamanho médio das micropartículas.....	111
7.2.2.6. Morfologia de coacervados gerados.....	113
7.2.2.7. Verificação da presença de óleo encapsulado.....	114
7.2.3. ATIVIDADE FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA <i>IN VITRO</i> DO ÓLEO DE <i>C. CITRATUS</i> LIVRE E ENCAPSULADO.....	115
7.2.4. Caracterização dos revestimentos	116
7.2.5. Avaliação do efeito curativo dos revestimentos bioativos sobre tomates.....	118
7.2.6. Avaliação da vida de prateleira de tomates revestidos durante armazenamento.. 120	
7.2.6.1. Perda de peso dos tomates	121
7.2.6.2. Determinação da cor instrumental de tomates revestidos	121
7.2.6.4. Avaliação das mudanças do pH em tomates revestidos.....	125
7.2.6.5. Avaliação do efeito de revestimentos bioativos sobre SST em tomates.....	126
7.2.6.6. Análises de acidez titulável	127
7.2.6.7. Identificação do índice de maturação de tomates revestidos	128
8. DISCUSSÃO.....	129
8.1. DISCUSSÃO DO ESTUDO 1.....	129
8.2. DISCUSSÃO DO ESTUDO 2.....	136
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	146
9.1. CONCLUSÕES DO ESTUDO 1	146
9.2. PERSPECTIVAS DO ESTUDO 1.....	147
9.3. CONCLUSÕES DO ESTUDO 2	148
9.4. PERSPECTIVAS DO ESTUDO 2.....	150
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	152
11. APÊNDICES.....	177

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Recopilação de estudos de composição química do óleo essencial de <i>C. citratus</i>	23
Quadro 2 - Estudos sobre microencapsulação por coacervação complexa	32
Quadro 3 - Grupos experimentais dos ensaios de revestimento em frutos	63
Quadro 4 - Condições experimentais de coacervação complexa no presente estudo	71
Quadro 5 - Formulações de revestimentos comestíveis	76
Quadro 6 - Grupos experimentais dos ensaios de revestimento em tomates	79
Quadro 7 - Caracterização química dos óleos essenciais de folhas de <i>Annona acutiflora</i> (OEAA) e <i>Xylopi ochrantha</i> (OEXO) por CG/EM e CG/DIC	84
Quadro 8 - Caracterização de emulsões usadas no ensaio <i>in situ</i> pelo método DLS.....	90
Quadro 9 - Caracterização química do óleo essencial de folhas de <i>C. citratus</i> por CG-EM e CG-DIC.....	100
Quadro 10 – Experimentos para a seleção do sistema ideal de coacervação complexa	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Caracterização de nanoemulsões do óleo essencial de <i>C. citratus</i> (Ne-OECc).....	86
Tabela 2 – Variações do índice de maturidade de bananas.....	99
Tabela 3 – Caracterização da formação de partículas coacervadas	111
Tabela 4 – Concentrações fungistática e fungicidas do óleo essencial <i>C. citratus</i> em forma livre e encapsulada contra o fungo <i>A. alternata</i>	116
Tabela 5 - Propriedades físico-químicas das emulsões formadores de filmes.....	117

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Índices de produção de banana no mundo e no Brasil..	6
Figura 2 - Morfologia do fungo <i>Thielaviopsis ethacetica</i> .	9
Figura 3 - Produção de tomate no mundo e no Brasil.....	10
Figura 4 - Tomate infectado por <i>Alternaria alternata</i> com observação microscópica dos conídios do fitopatógeno.....	11
Figura 5 - Atividades dos produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica no Brasil..	14
Figura 6 - Estrutura química do cinamaldeído.	20
Figura 7 - Diagrama esquemática de emulsões.....	26
Figura 8 - Esquema de microencapsulação de óleos essenciais.....	29
Figura 9 - Esquema do processo de formação de micropartículas por coacervação complexa.	30
Figura 10 - Classificação de biopolímeros.	34
Figura 11 - Estrutura molecular do alginato.....	35
Figura 12 - Estrutura básica da molécula da gelatina.	36
Figura 13 – Estrutura química de amilose (a), amilopectina (b).....	39
Figura 14 - Espaço de “HunterLab”.....	43
Figura 15 – Esquema experimental do Estudo 1.	54
Figura 16 - Texturometro perfurando uma banana tratada.	65
Figura 17 – Esquema experimental do Estudo 2.....	66
Figura 18 - Caracterização das nanoemulsões por DLS.....	86
Figura 19 - Perfil antifúngico de nanoemulsões e derivados vegetais procedentes do PNRJ contra o fungo <i>T. ethacetica</i> (The).	88
Figura 20 – Perfil antifúngico de óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (OECc) e da nanoemulsão Ne-OECC (F5) contra <i>T. ethacetica</i>	89
Figura 21 – Potencial fungistático e fungicida de derivados e emulsões contra <i>Thielaviopsis ethacetica</i> (The).....	91
Figura 22 – Efeito das emulsões e o cinamaldeído sobre o desenvolvimento micelial de <i>T. ethacetica</i>	92
Figura 23 – Efeito das emulsões na contagem de unidades formadoras de colônias em bananas.	93
Figura 24 - Monitoramento das coordenadas e atributos de cor das bananas tratadas com emulsões durante armazenamento a 25 °C.....	95
Figura 25 – Avaliações da textura pelo ensaio de punção de banana tratada com emulsões durante seu armazenamento a 25 °C.....	96
Figura 26 – Efeito do teor de sólidos solúveis totais nas polpas da banana tratada com emulsões durante o armazenamento a 25 °C durante 10 d.....	97
Figura 27 – Monitoramento do pH da polpa das bananas tratadas com emulsões.	98

Figura 28 – Teores de acidez titulável da polpa das bananas durante o armazenamento a 25 °C.....	99
Figura 29 – Distribuição de cargas dos biopolímeros de estudo para o processo de microencapsulação..	101
Figura 30 – Comportamento do par polimérico alginato 300 e gelatina tipo B (ALG.300-GEb) nas proporções de 1:4,5 e 1:5 em função de alternância do pH.....	110
Figura 31 – Distribuição do diâmetro de volume médio das micropartículas analisadas por espalhamento de luz de laser.	113
Figura 32 – Micrográficos das partículas geradas por coacervação complexa encapsulando o óleo essencial <i>C. citratus</i> por fase de contraste em microscópio ótico.	114
Figura 33 – Perfil por espectrofotometria e cromatografia do conteúdo de partículas em comparação com o padrão citral.	115
Figura 34 – Imagens da avaliação qualitativa da efetividade do recobrimento com revestimentos a base de fécula de mandioca usando iodo.....	118
Figura 35 – Avaliação antifúngica <i>in situ</i> dos revestimentos bioativos sobre o efeito de <i>A. alternata</i> durante o armazenamento de tomates.....	120
Figura 36 - Porcentagem de perda de peso de tomates revestidos durante armazenamento de 9 d a 25 °C.	121
Figura 37 – Avaliação de parâmetros de cor dos tomates revestidos durante seu armazenamento. Box representam as medianas dos valores e o percentil 5 e 95%.....	123
Figura 38 – Mudanças de textura pelo teste mecânico de punção em tomates revestidos durante o período de armazenamento de 9 d a 25 °C..	125
Figura 39 – Variações de pH da polpa de tomates tratados com revestimentos bioativos.....	126
Figura 40 – Efeito dos sólidos solúveis totais em tomates revestidos.....	127
Figura 41 – Determinação da porcentagem de acidez total em tomates revestidos durante seu armazenamento a 25 °C.....	127
Figura 42 – Índice de maturação dos frutos tratados com revestimentos bioativos.	128

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ΔE - Variação total de cor

a^* - Coordenada cromática vermelho/verde

A_{630} - Absorbância no comprimento de 630 nm

ABRASCO - Associação Brasileira de Saúde Pública

ADE – Água destilada estéril

ALG - Alginato

ALG.300 – Alginato com viscosidade de 300 mPa.s

ALG. 387 - Alginato com viscosidade de 387 mPa.s

A. *alternata* - *Alternaria alternata*

A/O – Emulsão de água em óleo

AM – Amido de mandioca

ANOVA – Análise de variância

A. *acutiflora* - *Annona acutiflora*

AOAC - Associação de Produtos Químicos Agrícolas

AACPD - Área abaixo da curva de progresso da doença

AME - Éter monometílico de alternariol

AOH - Alternariol

ALT - Altenueno

APT – Meio nutritivo ágar polpa de tomate

AT - Acidez triturável

b^* - Coordenada cromática amarelo/azul

BDA – Meio nutritivo batata dextrose ágar

Bloco M - Ácido β -D-manurônico

Bloco G - Ácido α -L-gulurônico

BOD – Demanda bioquímica de oxigênio

CAT - Catalase

C^* - Croma (saturação)

Cin – Cinamaldeído

Cin-p - Cinamaldeído puro

CCT - Coleção de Culturas Tropicais da Fundação de Pesquisa André Tosello

C. *citratu* – *Cymbopogon citratu*

CFM – Concentração fungicida mínima

CIM – Concentração inibitória mínima

CH₃COOH - Ácido acético glacial

CG/EM - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CG-DIC - Cromatografia gasosa com Detector de Ionização de Chama

CIE - Comissão Internacional de Iluminação

CLSI - Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

DNA - Ácido desoxirribonucleico

$D_{4,3}$ - Diâmetro médio do volume da partícula

E-AaCin - Emulsão primaria combinada do óleo essencial de *A. acutiflora* e cinamaldeído

E-Cin – Emulsão primária de cinamaldeído
EFF – Emulsão formado de filme
EHL - Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
EDL - Espalhamento Dinâmico da Luz
EPC - Eficiência do processo de complexação
EPM - Erro padrão da média
Eq wt - Massa equivalente
FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FDA - Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
Fm - Fragmentos de micélio
GRAS – Agente geralmente reconhecido como seguro
HTS – triagem de alto rendimento
INCA - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
IR - Índices de retenção
ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
INCAPER - Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural
IPD - Índice de polidispersividade
° Hue – Matiz da cor
HCl – Ácido clorídrico
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
GEa - Gelatina tipo A
GEb – Gelatina tipo B
GA – Goma arábica
GL - Graus de liberdade
L* - Coordenada de luminosidade
Log Pow - Coeficiente de partição octanol-água
MBC – Concentração bactericida mínima
MDA - Malondialdeído
MEA - Meio nutritivo ágar Extrato de Malte
Mr - Micélio reprodutivo
Mv - Micélio vegetativo
η_{ap} - Viscosidade aparente
NAOH – Hidróxido de sódio
NE – Nanoemulsão
NE OEaA: Nanoemulsão do óleo essencial de *Annona acutiflora* F3
Ne-OECc – Nanoemulsão do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* F3
NE OEXo - Nanoemulsão do óleo essencial de folhas de *Xylopiya ochrantha* F3
OE – Óleo essencial
OEaA - Óleo essencial de *Annona acutiflora*
OEaA-p - óleo essencial puro de *Annona acutiflora*
OECc - Óleo essencial de *Cymbopogon citratus*
OEXo - Óleo essencial de *Xylopiya ochrantha*

O/A: Emulsão óleo em água
 ρ - Densidade relativa
p.0,50% - Micropartícula contendo 0,50% do óleo essencial de *C. citratus*
p.0,25% - Micropartícula contendo 0,25% do óleo essencial de *C. citratus*
PEA – Proteína de ervilha
pI – Ponto isoelétrico
pHc - pH de coacervação
PNRJ – Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba
Potencial ζ – Potencial zeta
QUI - Quitosana
QM - Quadrado médio
ROS - Espécies reativas de oxigênio
SDB – Caldo Sabouraud dextrose
SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SisGen – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
ST - Teor de sólidos totais
SST – Sólidos solúveis totais
STfx – Sólidos totais fixos
SS - Soma dos quadrados
TeA - Ácido tenuazônico
TEN - Tentoxina
T. ethacetica – *Thielaviopsis ethacetica*
TR - Tempo de retenção
The – *Thielaviopsis ethacetica*
TSA – Teste de sensibilidade a antimicrobianos
UFC - Unidades formadoras de colônias
UV – Radiação ultravioleta
X. ochrantha - *Xylopiia ochrantha*

RESUMO

A deterioração das frutas devido à ação de fitopatógenos é uma das principais causas de perda da produção agrícola em todo o mundo. Produtos químicos ligados a problemas ambientais e de saúde humana continuam a sendo usados para controlar fungos fitopatogênicos na cadeia de produção agrícola. Portanto, o desenvolvimento da biotecnologia a partir de recursos vegetais, como os óleos essenciais, é uma estratégia promissora para o controle de agentes degradantes na fase pós-colheita. Esta pesquisa teve como objetivo estudar o potencial biotecnológico de óleos essenciais obtidos de plantas do Estado do Rio de Janeiro para o controle de fungos fitopatogênicos de interesse agrícola. Foram estudados dois diferentes fungos com diferentes patossistemas, de modo que esta pesquisa foi estruturada em dois estudos abrangentes. O Estudo 1 teve como objetivo testar o efeito *in vitro* e *in situ* de dois óleos essenciais de plantas endêmicas, *Annona acutiflora* e *Xylopiya ochrantha* e cinamaldeído, sobre o fungo *T. ethacetica* e na vida útil de bananas durante o armazenamento. As formas emulsionadas de óleo essencial de *A. acutiflora* e cinamaldeído têm potencial fungicida contra *T. ethacetica*, reduzem a microbiota da banana e não afetam negativamente os parâmetros físico-químicos da fruta durante o armazenamento. Enquanto isso, o Estudo 2 visou formular revestimentos de amido de mandioca com base em micropartículas coacervadas contendo óleo essencial de *Cymbopogon citratus* para avaliar seu efeito fungicida sobre o fitopatógeno *Alternaria alternata* e os aspectos de qualidade de tomates armazenados. A microencapsulação aprimorou a atividade antifúngica *in vitro* e *in situ* do óleo essencial de *C. citratus* contra *A. alternata*, reduzindo a ação do patógeno sobre os tomates. Os revestimentos comestíveis de mandioca com micropartículas de óleo essencial incorporadas não afetam as propriedades físico-químicas dos tomates armazenados. Dessa forma, os derivados das plantas estudadas se mostraram promissores no combate dos fungos fitopatógenos alvo, representando uma alternativa biotecnológica e ecologicamente aceitável para o controle de degradação de frutos na fase pós-colheita.

Palavras chaves: óleos essenciais, potencial bioantifúngico, micropartículas, revestimentos, banana, tomate, nanoformulações.

ABSTRACT

Fruit spoilage due to the action of phytopathogens is one of the main causes of loss of agricultural production worldwide. Chemicals linked to environmental and human health problems continue to be used to control phytopathogenic fungi in the agricultural production chain. Therefore, the development of biotechnology from plant resources, such as essential oils, is a promising strategy for controlling degrading agents in the post-harvest phase. The aim of this research was to study the biotechnological potential of essential oils obtained from plants in the state of Rio de Janeiro for the control of phytopathogenic fungi of agricultural interest. Two different phytopathogenic fungi with different pathosystems were studied, so this research was structured into two comprehensive studies. Study 1 aimed to test the *in vitro* and *in situ* effect of two essential oils from endemic plants, *Annona acutiflora* and *Xylopiya ochrantha* and cinnamaldehyde, on the fungus *T. ethacetica* and on the shelf life of bananas during storage. The emulsified forms of *A. acutiflora* essential oil and cinnamaldehyde have fungicidal potential against *T. ethacetica*, reduce the banana microbiota and do not negatively affect the physicochemical parameters of the fruit during storage. Meanwhile, Study 2 aimed to formulate cassava starch coatings based on coacervated microparticles containing *Cymbopogon citratus* essential oil to evaluate their fungicidal effect on the phytopathogen *Alternaria alternata* and the quality aspects of stored tomatoes. Microencapsulation increases the *in vitro* and *in situ* antifungal activity of *C. citratus* essential oil against *A. alternata*, reducing the pathogen's action on tomatoes. Edible cassava coatings with incorporated essential oil microparticles do not affect the physicochemical properties of stored tomatoes. Thus, the plant derivatives studied showed promise in the fight against target phytopathogenic fungi, representing a biotechnological and ecologically acceptable alternative for the control of degradation of fruits in the post-harvest phase.

Key-words: essential oils, bioantifungal potential, microparticles, coatings, banana, tomato, nanoformulations.

1. INTRODUÇÃO

Diante de um grave problema de segurança alimentar e de uma alta tendência de fome em muitas regiões, tem sido buscado o controle de vetores de doenças agrícolas, como é o caso dos fungos filamentosos (FISHER *et al.*, 2012). As frutas se tornam um excelente substrato para o desenvolvimento e a expansão de espécies de fungos na fase pós-colheita. Os fungos são capazes de infectar a superfície das frutas, produzindo micotoxinas que levam à deterioração da qualidade nutricional e sensorial desses alimentos agrícolas e causar danos à saúde humana (DAS; GHOSH; MUKHERJEE, 2021). Apesar disso, a deterioração microbiana de frutas é uma das causas mais prevalentes de perda de frutas em todo o mundo (YANG *et al.*, 2017). Os danos da ação patogênica na cadeia agroalimentar não se limitam ao prejuízo da perda do alimento, mas também levam a perdas econômicas milionárias para o setor agrícola (SINGH *et al.*, 2023), e a problemas de saúde pública silenciosos e pouco explorados em muitos países, resultantes dos resíduos de pesticidas ou micotoxinas presentes nas frutas que chegam à mesa do consumidor (ARCELLA; ESKOLA; GÓMEZ RUIZ, 2016; CARNEIRO *et al.*, 2015). O controle de fungos fitopatogênicos sob a perspectiva da biotecnologia é uma estratégia atual promissora (DUARTE *et al.*, 2023). Nessa perspectiva se encaixa o estudo da atividade antifúngica de óleos essenciais e sua veiculação por emulsificação, microencapsulação e revestimentos comestíveis (DOS PASSOS BRAGA *et al.*, 2020; MACEDO *et al.*, 2020; TOMAZONI *et al.*, 2017).

Neste projeto, foi abordada a problemática de duas culturas de grande importância para a agricultura brasileira, a cultura da banana e a do tomate, razão pela qual este trabalho foi estruturado em dois grandes estudos. O *Estudo 1* visa identificar uma alternativa vegetal para o controle de um fungo fitopatogênico degradador de frutos de banana. A banana, além de ser uma das culturas tropicais mais cultivadas no mundo devido ao seu baixo custo e alto valor nutritivo, também gera uma contribuição socioeconômica muito relevante nos países em desenvolvimento, pois serve como fonte de geração de renda e alimento em muitas comunidades com limitações econômicas (MASEKO *et al.*, 2024). A cultura da banana é de grande importância no Brasil devido aos altos volumes produzidos, bem como à alta taxa de comercialização e consumo para diferentes fins (FIRETTI *et al.*, 2024). No entanto, a banana é alvo de doenças ao longo dos diferentes estágios da cultura, especialmente no

período pós-colheita (DE MELO *et al.*, 2016). Estima-se que a falta de práticas de manejo adequado, a redução de cultivares com alta produção e os graves problemas fitossanitários tenham induzido à baixa produtividade do cultivo da banana no Brasil (FIRETTI *et al.*, 2024). A banana é alvo de doenças ao longo dos diferentes estágios da cultura, especialmente no período pós-colheita. Essas doenças são causadas por um complexo de fungos filamentosos que afetam seriamente a qualidade nutricional e comercial da banana, incluindo o fungo ascomiceto *Thielaviopsis ethacetica*, o agente causal da podridão da coroa da banana (DE MELO *et al.*, 2016). Esse fungo saprófito, descrito anteriormente como *Thielaviopsis paradoxa* (MBENOUN *et al.*, 2014) também é o agente responsável pela podridão do abacaxi, podridão da cana-de-açúcar e podridão basal da palma (BORGES *et al.*, 2019).

Thielaviopsis ethacetica é um fungo que pode sobreviver por um longo período no solo e é considerado um patógeno de difícil controle fitossanitário. Assim, o presente estudo explora o potencial dos óleos essenciais de plantas nativas brasileiras, como *Annona acutiflora*, *Xylopiya ochrantha*, *Cymbopogon citratus* e um composto volátil padrão, como o cinamaldeído. Em vista de várias limitações dos óleos essenciais, como alta volatilidade, hidrofobicidade e sensibilidade à luz, propõe-se a aplicação de técnicas de emulsificação por métodos de baixa e alta energia para superar essas limitações físico-químicas e aplicar os derivados de plantas contra o fitopatógeno *T. ethacetica*. Além disso, foi avaliado o efeito de formulações emulsificadas sobre as propriedades físico-químicas da banana durante o armazenamento com temperatura controlada.

O *Estudo 2* desta tese aborda um problema enfrentado pela cadeia produtiva do tomate em sua fase pós-colheita, a doença causada pelo fungo *Alternaria alternata* (SHARMA *et al.*, 2021). O tomate é uma das hortaliças cultivadas em todo o mundo, destinada ao consumo *in natura* ou como insumo para o processamento industrial. Seus diversos usos culinários e seu alto valor nutricional o tornaram um produto altamente demandado que gera retornos econômicos altos (DÉLICES *et al.*, 2019). O Brasil nos últimos anos se posicionou como um dos maiores produtores de tomate da América Latina (FAO, 2023). No entanto, as etapas de pós-colheita dessa hortaliça são altamente críticas, pois enfrentam fatores abióticos e bióticos, como fungos degradadores, que podem afetar drasticamente o produto (KHATRI *et al.*, 2020). Embora *A. alternata* seja um fungo presente em todos os estágios de desenvolvimento do tomate, seu efeito durante a fase pós-colheita, causando a pinta preta, é considerado devastador para a produção final (MOGHADDAM *et*

al., 2019). Além disso, este fungo também ataca outras culturas, como algodão, manjerona, aveia, caqui, cevada, feijão, crisântemo, mamão, fumo e maçã no território brasileiro (MAPA, 2016), e seu controle por meio de estratégias sustentáveis é uma necessidade para o setor agroalimentar.

Assim, o *Estudo 2* baseia-se na hipótese de que a aplicação do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, um derivado vegetal descrito como tendo propriedades antimicrobianas (KAMSU *et al.*, 2019; MACEDO *et al.*, 2020), poderia ser um agente eficaz no controle do fungo agressivo da pinta preta em tomate. Para isso, a atividade fungistática e fungicida do óleo sobre os conídios do fitopatógeno foi avaliada em condições *in vitro*. Além disso, para aprimorar seu efeito e evitar as limitações da aplicação de óleos essenciais em alimentos, foi proposto a microencapsulação do derivado vegetal promissor por coacervação complexa usando biopolímeros amplamente utilizados na indústria alimentícia, como o alginato e a gelatina tipo B. Posteriormente, revestimentos comestíveis à base de amido de mandioca foram desenvolvidos e caracterizados para servir como matrizes transportadoras de micropartículas contendo o derivado vegetal promissor. O efeito *in situ* dos revestimentos bioativos sobre os parâmetros físico-químicos dos tomates durante o armazenamento de prateleira, com e sem infecção artificial por conídios de *A. alternata*, foi avaliado.

Em síntese, a presente tese busca explorar as propriedades antifúngicas de derivados de plantas do estado do Rio de Janeiro que, quando aplicados de forma biotecnológica, possam contribuir para o controle da deterioração fúngica na fase pós-colheita de duas frutas modelo de importância social e econômica para o Brasil. Dos dois estudos do presente projeto, serão elaborados dois artigos científicos. Adicionalmente, no Apêndice A apresenta-se a lista de artigos ou capítulos de livros que foram publicados ou que estão sob edição pelo autor da tese.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O IMPACTO DE PATÓGENOS NA PRODUÇÃO AGRÍCOLA

O aquecimento global e seus efeitos no clima terão uma contribuição cada vez mais forte para a sobrevivência e a atuação de muitos patógenos durante as próximas décadas (ALMEIDA; RODRIGUES; COELHO, 2019; SINGH *et al.*, 2023). A ação patogênica das espécies fúngicas envolve afecções humanas, mas também impacta a saúde animal e as culturas agroalimentares (ALMEIDA; RODRIGUES; COELHO, 2019). As doenças agrícolas são um processo fisiológico anormal local ou sistêmico em uma planta causado pela infestação contínua e prolongada de fitopatógenos, e afetam negativamente a saúde e a produtividade de uma ampla gama de plantas hospedeiras (FISHER *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2023; TYAGI *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020). A degradação microbiana tem sido considerada como principal fator responsável pelo desperdício de frutos em todo o mundo (YANG *et al.*, 2017), de forma que foram identificadas perdas financeiras substanciais acima dos US\$ 220 bilhões de dólares anuais na cadeia de produção agrícola mundial devido à ação de patógenos microbianos e pragas (SINGH *et al.*, 2023). Estima-se que cerca de um terço das culturas alimentares sejam destruídas a cada ano por doenças agrícolas fúngicas, o que agrava cada vez mais a situação de pobreza no mundo (FISHER *et al.*, 2012).

De acordo com as estatísticas globais de 2009 a 2010, as cinco culturas mais importantes do mundo - trigo, arroz, milho, batata e soja - sofreram perdas consideráveis induzidas por fungos fitopatogênicos (FISHER *et al.*, 2012). As previsões indicam que, no caso hipotético dessas cinco culturas serem completamente devastadas simultaneamente por doenças fúngicas, mais de 60% da população mundial estaria em situação de risco alimentar (FISHER *et al.*, 2012). Outras culturas produzidas estritamente na região tropical, como especiarias, mangas, café, bananas e alguns frutos secos, são fortemente afetadas por infecções fúngicas o que impacta ainda mais o cenário alimentar no mundo (ALMEIDA; RODRIGUES; COELHO, 2019). Fungos fitopatogênicos também podem gerar prejuízos à segurança alimentar devido à contaminação por micotoxinas que estes produzem durante a etapa de armazenamento de frutos, grãos e frutos secos (ARCELLA; ESKOLA; GÓMEZ RUIZ, 2016). A falta de tecnologias de biodefesa agrícola, principalmente na região neotropical, ameaça as economias dos países em desenvolvimento, além de gerar um risco alimentar

para os países desenvolvidos, onde não existem condições climáticas e ambientais para realizar a produção de certos alimentos. Enquanto isso, apesar desse panorama preocupante, as doenças fúngicas continuam a ser subestimadas na política de desenvolvimento global mesmo no setor clínico, no qual poderiam facilmente ser consideradas doenças tropicais negligenciadas e receber uma maior atenção (ALMEIDA; RODRIGUES; COELHO, 2019). Portanto, a formulação de estratégias sustentáveis de controle de fungos fitopatogênicos da cadeia de produção agrícola é imperativo a fim de prevenir e combater os diferentes efeitos adversos destes fungos sobre as culturas e seus produtos agrícolas. Das culturas de grande importância econômica e produtiva no território brasileiro são as culturas da banana e o tomate, que também são fortemente expostas a doenças causadas por fungos filamentosos (DE MELO *et al.*, 2016; ZORZI TOMAZONI *et al.*, 2019).

2.1.1. IMPORTÂNCIA E LIMITAÇÕES DA CULTURA DA BANANA

A banana (*Musa spp.*, família Musaceae) é uma planta perene conhecida em todo o mundo por seus frutos comestíveis (MASEKO *et al.*, 2024). É uma planta tropical que requer chuvas distribuídas, solos úmidos e uma temperatura ótima de 28 °C, com limites térmicos entre 15 e 35 °C (BORGES, *et al.*, 2009). Essa planta tem um alto consumo de água e, portanto, exige uma precipitação mensal mínima de 150 mm. A banana geralmente cresce em solos franco-arenosos com porosidade e drenagem suficientes, com altos níveis de nutrientes e pH entre 5 e 7,5 (MEJIA, 2013). É uma planta anual que cresce em altitudes de até 2.000 m acima do nível do mar, e um amplo espectro de radiação solar, pois pode crescer em regiões de alta nebulosidade ($184 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) até alta irradiância ($1.500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (MEJIA, 2013).

A cultura da banana desempenha um papel socioeconômico relevante nos países em desenvolvimento, pois essa cultura permite a geração de renda e contribui para a segurança alimentar de muitas comunidades (AMORIN; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011; FAO, 2024; MASEKO *et al.*, 2024). A banana é uma das frutas mais cultivadas no mundo devido ao seu baixo custo e alto valor nutricional, estando presente em mais de 130 países em áreas tropicais e subtropicais (AMORIN; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011; KUYU; TOLA, 2018). Além das características sensoriais, como textura e sabor, os diferentes potenciais nutricionais da banana fazem dela uma das frutas mais atraentes e populares no consumo mundial de frutas (KUYU; TOLA, 2018). As bananas são fonte de fibra alimentar, potássio,

magnésio, fósforo, vitamina B6, vitamina C, vitamina B12, manganês, baixo teor de gordura, alta contribuição calórica, ácidos fenólicos, flavonoides, catecolaminas e terpenóides (AMORIN; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011; KUYU; TOLA, 2018; MASEKO *et al.*, 2024)

A cultura da banana contribui com a produção mundial de frutas. Estima-se que 90% das importações de banana nos países em desenvolvimento sejam provenientes da produção nas Américas Central e do Sul e nas Filipinas (FAO, 2024). De acordo com relatórios da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, a produção mundial de banana em 2022 atingiu mais de 136 milhões de toneladas, das quais 14% foram produzidas na América do Sul (FAO, 2023). O Brasil destaca-se entre os dez maiores produtores de banana do mundo, com uma produção de 6,8 milhões de toneladas em uma área cultivada de 457.910 ha (Figura 2a) (FAO, 2023). A produção de banana nacional nos últimos 10 anos foi superior a 6,5 milhões de toneladas, sendo variáveis, mas com uma tendência de aumento no rendimento da produção (relação entre volume produzido por unidade de área cultivada), conforme ilustrado na Figura 2b. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o valor da produção da banana atingiu valores acima de 8,6 bilhões de reais, o que representou 1,05% da renda total da produção agrícola nacional em 2022 (IBGE, 2023).

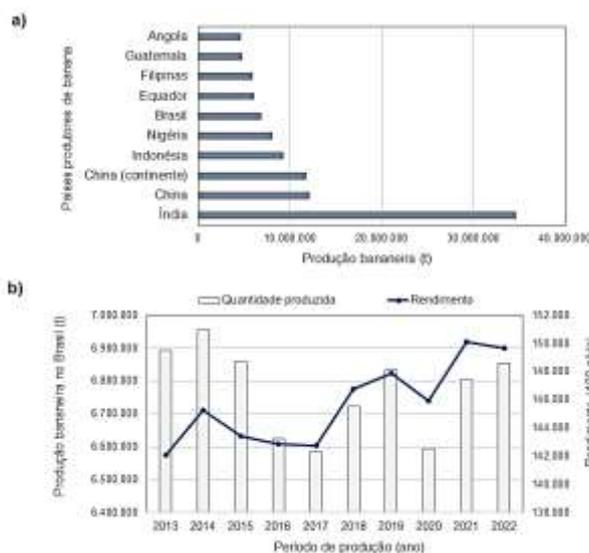


Figura 1 - Índices de produção de banana no mundo e no Brasil. a) Ranking dos maiores produtores de banana durante o ano 2022 no mundo. b) Produção e rendimento da cultura bananeira no Brasil durante os últimos dez anos. **Fonte:** Elaboração do autor baseado em dados extraídos da Base de Dados FAOSTAT (FAO, 2023).

No entanto, a cadeia produtiva da banana enfrenta desafios significativos que limitam o seu potencial de mercado, resultando em perdas de até mais de um terço da produção (DE MELO *et al.*, 2016). O desenvolvimento da podridão pós-colheita é estimulado por fatores fisiológicos como a produção de etileno e fatores abióticos (BORGES, *et al.*, 2009). Essa podridão, causada por fungos filamentosos endofíticos, impede a venda do fruto ao consumidor, pois o fruto é degradado por patógenos durante as etapas de transporte e comercialização (DE MELO *et al.*, 2016). Embora a podridão ocorra na coroa da banana, ela pode se estender ao caule. A podridão é caracterizada por um rápido endurecimento da fruta, com escarificação externa da casca e amolecimento interno da polpa (FRANÇA *et al.*, 2024). O complexo fúngico diversificado, incluindo *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Von Arx., *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *Fusarium. musae* Van Hove, *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg, *Fusarium semitectum* Berk. & Ravenel, *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., e *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) Höhn, é responsável por esta doença agrícola (DE MELO *et al.*, 2016; FRANÇA *et al.*, 2024).

2.1.1.1. *Thielaviopsis ethacetica*

O fungo ascomiceto *Thielaviopsis paradoxa* (*T. paradoxa*) é um anamorfo do *Ceratocystis paradoxa* que, por sua vez, era conhecido como um fitopatógeno amplamente distribuído no mundo que tinha incidência negativa em plantas monocotiledôneas e seus órgãos senescentes em regiões tropicais e subtropicais (BORGES *et al.*, 2019; MBENOUN *et al.*, 2014). No entanto, a partir de uma análise filogenética rigorosa de dados de sequenciamento de DNA de três regiões genéticas (60S, LSU, MCM7) de isolados de *Ceratocystis* de diferentes linhagens, foram distinguidas dentro de complexos fúngicos com atributos morfológicos e ambientais semelhantes (DE BEER *et al.*, 2014). No complexo *Thielaviopsis paradoxa* sensu lato, foram distinguidos três clados. No primeiro clado, foram designadas as espécies *T. euricoi* e *T. paradoxa* s. str, no segundo clado foram agrupadas duas espécies patogênicas com morfologia semelhante e de importância patogênica na fase pós-colheita, como *T. ethacetica* e *T. musarum*, e, finalmente, no terceiro clado foram compiladas as espécies que representam *T. paradoxa* s. lat, *T. cerberus* e *T. radicola* (Bliss) ZW De Beer & WC Allen (DE BEER *et al.*, 2014; MBENOUN *et al.*, 2014).

Apesar disso, o fungo continua sendo catalogado como *Ceratocystis paradoxa* na literatura e nas entidades oficiais da agricultura brasileira (BORGES *et al.*, 2019; DE MELO *et al.*, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2020; PINHO; DUTRA; PEREIRA, 2013). No trabalho de Melo *et al.* (2016) foi apontado que, um isolado (CMM 1739) de frutos de *Cocos nucifera* relatado como *T. paradoxa* por Pinho, Dutra e Pereira (2013), poderia ser classificado como *T. ethacetica* de acordo com o estudo de Mbenoum *et al.* (2014) e Melo *et al.* (2016). Por sua vez, Borges *et al.* (2019) relataram que, por meio de análises filogenéticas das sequências combinadas dos genes ITS e TEF-1a de isolados fúngicos, foi possível identificar *Thielaviopsis ethacetica* como o agente da doença podridão do abacaxi na cultura da cana-de-açúcar no Brasil, comumente associada a *T. paradoxa*. Além disso, Nascimento *et al.* (2020) relataram *T. ethacetica* como responsável pela podridão basal da palma de óleo. De Melo *et al.* (2016) identificaram em um teste de patogenicidade artificial que *T. ethacetica* (CMM 1739) junto a *T. musarum* (CMM 1525) foram capazes de causar podridão em bananas cv. 'Prata-Anã' após 8 dias de incubação. Os fungos patogênicos causaram uma casca escura com arranhões em sua superfície, além de produzir micélio cinza e escurecer e amolecer a polpa, o que impede seu consumo (DE MELO *et al.*, 2016).

Esse fungo ascomiceto saprófito pode sobreviver por um longo período, persistindo tanto na forma de endoconídios (conídios primários e conídios secundários) quanto de aleuroconídios (MBENOUN *et al.*, 2014). As colônias no meio nutritivo batata dextrose ágar (BDA) são inicialmente hialinas, tornando-se brancas a preto-acastanhadas com o período de crescimento (Figura 2). O micélio em uma placa é formado por discos com coloração marrom a acastanhada. Do ponto de vista microscópico, os conídios primários de *T. ethacetica* são hialinos, cilíndricos, asseptados, formando longas cadeias, medindo 4,0 - 14,5 x 4,0 - 8,0 µm. Os conídios secundários são inicialmente oblongos e hialinos, mas se desenvolvem em conídios ovais marrons e têm uma parede espessa com dimensões de 10,5-16,5 µm por 6,0 - 8,5 µm. Além disso, esse fungo produz um tipo de conídio de sobrevivência chamado aleuroconídios (clamidósporos), que se forma em cadeias curtas e é ovoide a subgloboso com uma parede espessa (MBENOUN *et al.*, 2014).

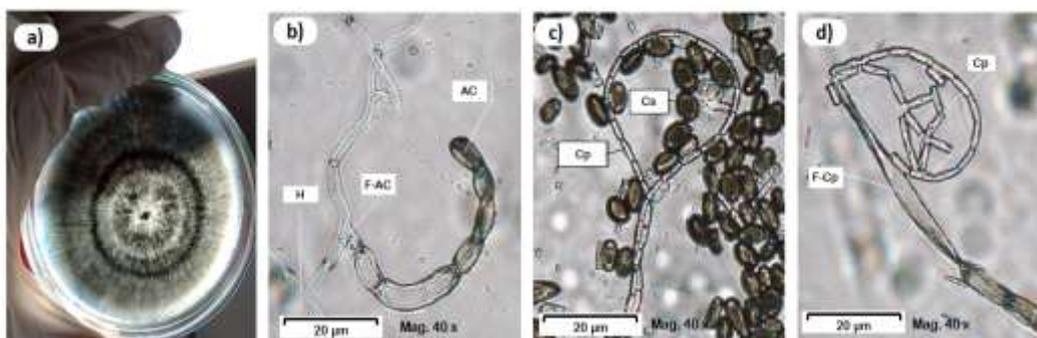


Figura 2 - Morfologia do fungo *Thielaviopsis ethacetica*. a) Colônia do fungo crescido em placa de BDA a 7 dias a 28 °C. b) Microscopia onde observa-se a expulsão de uma cadeia de aleuroconídios (AC) hialianos a partir de uma fialide especializada (F-AC); c) conídios primários (Cp) e conídios secundários (Cs) do fungo; d) expulsão de conídios primários (cp) a partir de uma fialide especializada (F-Cp). **Fonte:** Elaboração do autor.

2.1.2. CARACTERÍSTICAS E LIMITAÇÕES DA CULTURA DO TOMATE

O tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) é uma das principais hortaliças cultivadas globalmente, tanto para consumo *in natura* quanto para processamento industrial (BERTUZZI *et al.*, 2021; DÉLICES *et al.*, 2019; SANZANI *et al.*, 2019). Essa planta, nativa da região andina da América do Sul (ADHIKARI; OH; PANTHEE, 2017), ocupa um lugar importante na dieta diária e nas tradições culinárias de muitos países (MOGHADDAM *et al.*, 2019). Esse produto é uma excelente fonte de fibras, proteínas e ácido ascórbico (MUÑOZ CASTELLANOS *et al.*, 2020; SANZANI *et al.*, 2019) e contém um poderoso antioxidante natural conhecido como licopeno, responsável por prevenir a degeneração muscular, doenças da próstata e do coração (ABDEL-MOTAAL *et al.*, 2020; ADHIKARI; OH; PANTHEE, 2017; YASSER *et al.*, 2019). Assim, seu uso diversificado e seu alto valor nutricional fazem dele um produto de alta demanda (ADHIKARI; OH; PANTHEE, 2017), o que gera grandes ganhos econômicos (DÉLICES *et al.*, 2019).

No ano 2022, a produção mundial de tomate atingiu um volume aproximado de 186 milhões de toneladas. No mesmo período, o Brasil registrou uma produção de 3,8 milhões de toneladas de tomate com uma área de colheita de 54,5 mil hectares (FAO, 2023), destacando-se como um dos maiores produtores da América Latina (Figura 4a). No entanto, como mostra a Figura 3b, foi observada uma redução gradual na produção de tomate no Brasil, especialmente nos últimos cinco anos. Esta tendência está diretamente relacionada à redução das áreas colhidas, conforme indicado pelos dados oficiais.

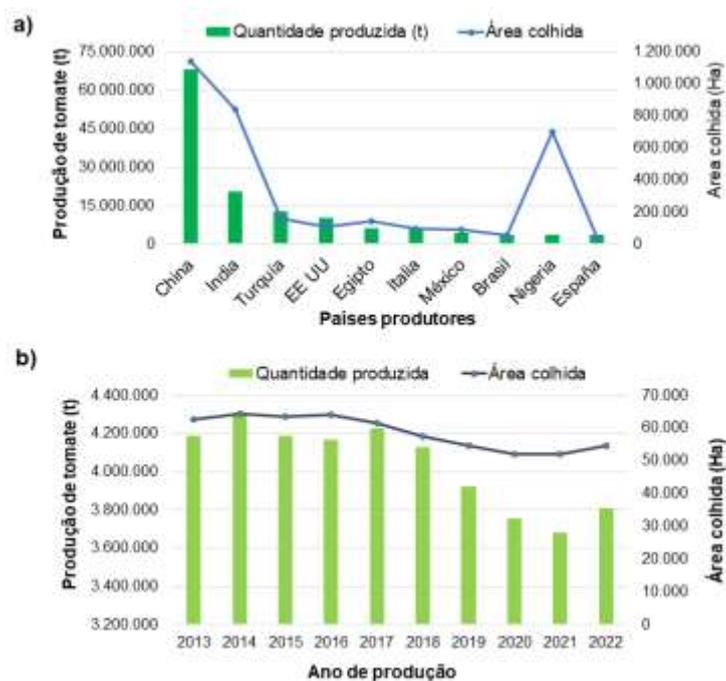


Figura 3 - Produção de tomate no mundo e no Brasil. **a)** Ranking dos maiores produtores de tomate durante o ano 2022 no mundo. **b)** Produção e rendimento da cultura de tomate no Brasil durante os últimos dez anos. **Fonte:** Dados extraídos da Base de Dados FAOSTAT (FAO, 2023).

No entanto, os frutos de tomate são altamente suscetíveis à deterioração devido às suas altas taxas de respiração e transpiração e à taxa de amadurecimento induzido, além de serem alvo de degradação por patógenos de plantas (KHATRI *et al.*, 2020). Apesar de ser cultivada em todo o mundo, essa planta tem diversidade genética restrita, o que a torna altamente suscetível a estresses abióticos (temperaturas extremas, alta umidade e poluição ambiental), pragas de insetos e doenças, além de atributos sensoriais reduzidos (DÉLICES *et al.*, 2019; SHARMA *et al.*, 2021). Entre algumas das doenças fúngicas que afetam fortemente a produtividade das culturas de tomate estão: requeima (*Alternaria solani*), tombamento (*Pythium* sp.), podridão do colarinho (*Sclerotium rolfsii*), requeima (*Phytophthora infestans*), murcha de *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) e requeima de alternaria e a pinta preta (*Alternaria alternata*) (SHARMA *et al.*, 2021).

2.1.2.1. *Alternaria alternata*

Um dos patógenos com alto impacto produtivo e econômico na cultura do tomate é o fungo filamentoso *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl (*A. alternata*) (ADHIKARI; OH; PANTHEE, 2017; AUNG *et al.*, 2020; FAGUNDES *et al.*, 2013). Este fungo pode penetrar na pele dos

tomates para infectar por meio de lesões causadas por cicatrizes de cálix, ferimentos por insetos, além do manuseio incorreto na etapa de coleta e transporte (Figura 4). Aliás, a germinação de conídios do fungo é estimulada na camada superficial do fruto pelos altos níveis de umidade provenientes de chuva, orvalho ou irrigação excessiva (SANTOS; MATTOS; MORETTI, 2016). O fungo *Alternaria* spp. se caracteriza por apresentar conídios em forma de clube, às vezes com bico que tem septos horizontais que podem ser produzidas em cadeia o de maneira individual de acordo a espécie. As hifas apresentam pigmentação escura pela melanina que serve como mecanismo protetor do fungo contra o estresse ambiental e que permite a sobrevivência dos conídios no solo por longos períodos (SANTOS; MATTOS; MORETTI, 2016).

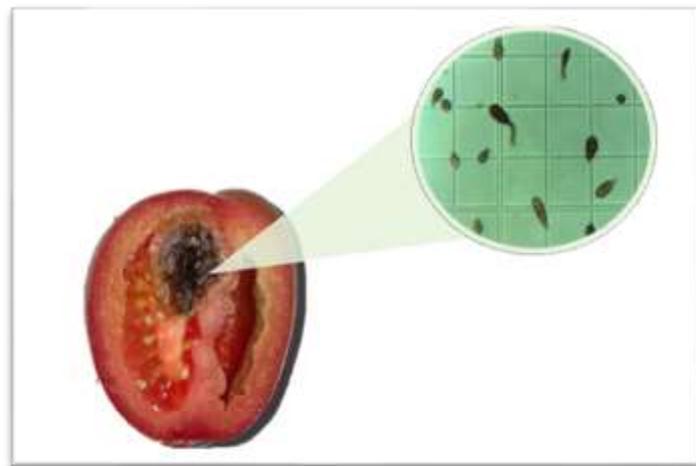


Figura 4 – Tomate infectado pelo fungo *Alternaria alternata* com observação microscópica dos conídios. Visualização de conídios de *A. alternata* com magnificação de 400x. **Fonte:** Elaboração do autor.

O fungo *A. alternata* pode afetar o tomateiro em todos os estágios de desenvolvimento, especialmente nas fases de colheita, sendo catalogado como um dos estresses bióticos mais devastadores em todo o mundo (MOGHADDAM *et al.*, 2019). Estima-se que as perdas econômicas na produção de tomate na Índia, EUA, Austrália, Israel, Reino Unido e Brasil devido a esse patógeno estejam entre 35% e 80% (MARTINKO *et al.*, 2022; MOGHADDAM *et al.*, 2019; YASSER *et al.*, 2019). Além de causar a pinta preta, a *A. alternata* é uma grande produtora de micotoxinas, que restringem a comercialização dos frutos, causando não apenas perdas econômicas, mas também um risco potencial à saúde pública (ARCELLA; ESKOLA; GÓMEZ RUIZ, 2016). De acordo com um relatório da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), os derivados de tomate têm altas concentrações

de micotoxinas produzidas por espécies de *Alternaria* na Europa (ARCELLA; ESKOLA; GÓMEZ RUIZ, 2016). Especificamente, descobriu-se que o ácido tenuazônico é a toxina de *Alternaria* mais prevalente no concentrado de tomate do norte da Itália (BERTUZZI *et al.*, 2021) e em tomates frescos e secos de uma região do sul da Itália (SANZANI *et al.*, 2019). A EFSA publicou um relatório científico indicando que a ingestão crônica de micotoxinas de *Alternaria* spp. pela comunidade europeia excede o limite de alerta toxicológico (PICCIONE, 2022). Mas a problemática sanitária também está presente no território brasileiro. Um estudo determinou que em duas marcas comerciais de ketchup na região Centro-Oeste do Brasil, estão presentes o alternariol (AOH) e o alternariol monometil éter (AME), duas micotoxinas produzidas por *A. alternata* (SANTOS; MATTOS; MORETTI, 2016).

Tradicionalmente, o controle de fitopatógenos tem sido realizado com a aplicação de fungicidas sintéticos (ADHIKARI; OH; PANTHEE, 2017; FAGUNDES *et al.*, 2013). No entanto, os efeitos negativos desses compostos geraram a necessidade de buscar alternativas mais seguras e eficientes para o controle fitossanitário (DUARTE *et al.*, 2022). *A. alternata* foi identificado como um patógeno de difícil controle e resistente aos pesticidas usados atualmente (AUNG *et al.*, 2020; MARTINKO *et al.*, 2022; YANG *et al.*, 2019). Portanto, várias alternativas foram adotadas para controlar essa espécie a fim de melhorar a vida útil do tomate, incluindo armazenamento a frio em um ambiente controlado, tratamento com radiação ionizada, controle biológico, imersão em uma solução de aditivo alimentar (FAGUNDES *et al.*, 2013), água quente (YASSER *et al.*, 2019) e embalagens biodegradáveis como biofilmes e revestimentos comestíveis (LANDI *et al.*, 2021).

2.2. PROBLEMAS NO CONTROLE FITOSSANITÁRIO CONVENCIONAL

Embora todos os setores produtivos gerem impactos ao meio ambiente, a agricultura como uma importante locomotiva econômica é atualmente um setor de preocupação a nível mundial devido aos insumos químicos usados para controlar pragas e doenças fitossanitárias nas lavouras (UPADHAYAY *et al.*, 2020). Inicialmente, a aplicação de fungicidas sintéticos mostrou-se como uma tecnologia que revolucionária o agronegócio, no entanto, ao longo das décadas, uma ampla gama de efeitos adversos foi identificada (TILOCCA; CAO; MIGHELI, 2020). Diferentes estudos científicos nacionais e internacionais determinaram que o uso de agrotóxicos coloca em risco a segurança ambiental e a saúde humana (CARNEIRO *et al.*, 2015; FENG *et al.*, 2023; TILOCCA; CAO; MIGHELI, 2020). Desde uma valoração ambiental,

essa classe de produtos, quando exposta ao meio ambiente, torna-se fator poluente do ar, das águas superficiais e subterrâneas, afetando também a fauna e a flora presentes nos diferentes ecossistemas circundantes das áreas de plantio (FENG *et al.*, 2023; NURNADIRAH; NENI; YUZIAH, 2018; ZAHARI *et al.*, 2014). Além disso, estudos científicos concluíram que os agrotóxicos podem afetar a saúde humana tanto dos trabalhadores agrícolas e das populações próximas aos cultivos, quanto dos consumidores finais de alimentos (CARNEIRO *et al.*, 2015; HESHMATI *et al.*, 2020). Os efeitos negativos na saúde humana incluem danos gastrintestinais, endócrinos, reprodutivos e neurológicos, neoplasias, mortes acidentais e suicídios (CARNEIRO *et al.*, 2015; PERES; MOREIRA, 2007).

Apesar da situação alarmante a nível mundial, atualmente é permitido o uso de mais de 500 princípios ativos de agrotóxicos no Brasil, sendo uma quinta parte deles proibidos pela União Europeia (GONÇALVES, 2016). Um levantamento conduzido pela Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO) no ano 2007 revelou que, dos 32 agrotóxicos mais utilizados nas lavouras do Estado, 17 deles apresentavam restrições severas em outros países. Além disso, oito desses pesticidas foram totalmente proibidos em outras nações (PERES; MOREIRA, 2007). A problemática dos agrotóxicos estende-se ao consumidor final, uma vez que resíduos desses compostos químicos podem ser encontrados nas próprias frutas tanto no exterior (HESHMATI *et al.*, 2020) como dentro do território brasileiro (GONÇALVES, 2016; INCA, 2023).

Adicionalmente, Perez e Moreira (2007) em seu estudo de campo sobre a perspectiva social dos agrotóxicos em uma área agrícola no Estado do Rio de Janeiro determinaram que, apesar de os agricultores pesquisados conhecerem os efeitos expostos, as pessoas acabaram legitimando uma prática perigosa como aplicação de agrotóxicos devido à falta de alternativas mais seguras para o controle agrícola. Portanto, instituições como a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), a Associação Brasileira de Saúde Pública (ABRASCO) e o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) têm alertado sobre os efeitos graves e irreversíveis provocados por este tipo de produtos na agricultura (CARNEIRO *et al.*, 2015; INCA, 2023). Congruentemente, o INCA recomendou a implementação de alternativas fitossanitárias focadas em estratégias da agroecologia, que sejam tão eficazes no controle quanto seguras e menos poluentes (INCA, 2023).

2.3. BIOPRODUTOS COMO AGENTES ALTERNATIVOS

Devido a problemática existente com o uso indiscriminado de agrotóxicos, diferentes alternativas têm sido propostas, sendo uma delas a pesquisa e desenvolvimento de produtos biotecnológicos a partir de compostos ativos de plantas e microrganismos (MIASTKOWSKA *et al.*, 2020; TILOCCA; CAO; MIGHELI, 2020). Um desses produtos de desenvolvimento para o setor agrícola são os biofungicidas que de maneira geral apresentam menores efeitos colaterais na eficiência agrônômica, no ambiente e na saúde humana pelos baixos valores de toxicidade e facilidade de biodegradação (DAMALAS; KOUTROUBAS, 2020). Também, os biofungicidas trazem benefícios indiretos como a menor probabilidade de indução de resistência dos fungos a esses produtos (DE SOUZA FERREIRA *et al.*, 2018; NEWMAN; CRAGG, 2012).

Apesar da ampla quantidade de estudos científicos que demonstram as eficientes propriedades antimicrobianas de substâncias de origem vegetal, ainda são poucos os produtos que são formulados e comercializados no mercado utilizando bioprodutos de origem vegetal para atender toda a demanda da agricultura orgânica e substituir os pesticidas sintéticos convencionais (ZAKER, 2016). No ano 2020, o Brasil reportava uma limitada oferta de produtos fitossanitários de origem natural. O Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou o registro de 119 produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica de origem biológico ou microbiológico no país, sendo os inseticidas o maior tipo de bioprodutos mais diversificados e especializados, enquanto existem um baixo número de bioprodutos acaricidas e fungicidas no mercado brasileiro como se mostra na Figura 6, dos quais 76% correspondem a inseticidas, 17.1% a acaricidas, 4.8% a fungicidas y 2.1% a nematocidas (MAPA, 2016).

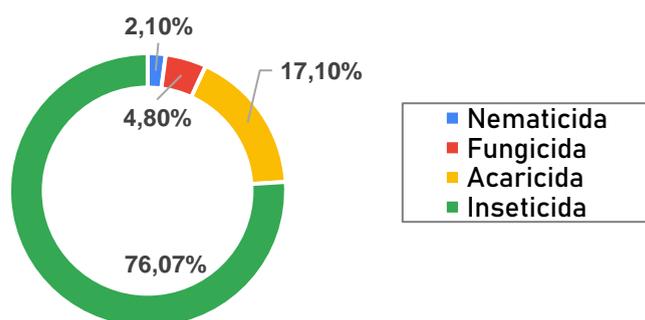


Figura 5 - Atividades dos produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica no Brasil. **Fonte:** Baseado em dados de cadastro publicado pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA, 2016).

2.4. RIQUEZA VEGETAL COMO FONTE DE SOLUÇÃO

As plantas aromáticas têm sido, claramente, parte integrante das tradições e culturas etnobotânicas em todo o mundo (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018). Essas plantas têm sido continuamente usadas como um recurso botânico econômico para várias finalidades, incluindo ritos religiosos, preparações saudáveis, higiene ambiental, aplicações terapêuticas, perfumaria, cosméticos e como agentes repelentes de insetos (GUERRINI *et al.*, 2023). Entre as formas extrativas mais comuns de plantas, destacam-se as infusões, os extratos vegetais e os óleos essenciais. Deste modo, existe um crescente interesse pelas diversas atividades que apresentam os óleos essenciais tais como larvicida, inseticida, antiviral, entre outros (SCARIOT *et al.*, 2020; TOMAZONI *et al.*, 2017; ZAKER, 2016). Uma ampla gama de estudos tem comprovado as atividades antifúngicas de diferentes óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas (ANTONIOLI *et al.*, 2020; COSTA *et al.*, 2020; FENG *et al.*, 2023; PEDROTTI *et al.*, 2022; ZORZI TOMAZONI *et al.*, 2019) Estes atributos são favoráveis para uma ampla série de indústrias, especialmente, na indústria alimentícia, onde os óleos essenciais podem ser aplicados como conservantes alimentares, usados em embalagens e contra os patógenos geradores de intoxicação alimentares (ASBAHANI *et al.*, 2015; OTONI *et al.*, 2014).

2.4.1. ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são derivados vegetais amplamente usados na indústria cosmética e na medicina tradicional, devido a suas múltiplas potencialidades biológicas. Os óleos essenciais são uma mistura complexa e heterogênea de hidrocarbonetos monoterpenos (C₁₀) e sesquiterpenos (C₁₅) e moléculas hidrogenadas, assim como fenilpropanóides, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, fenóis e ácidos orgânicos (TOMAZONI *et al.*, 2017). Estes são produtos químicos voláteis produzidos pelo metabolismo secundário de plantas aromáticas (SCARIOT *et al.*, 2020), resultantes da resposta da planta a estímulos externos, também atuando como mecanismo de defesa contra insetos e micróbios (ASBAHANI *et al.*, 2015). Estes compostos são armazenados em células epidérmicas, dutos secretos e canais glandulares tricomas de plantas, e podem ser extraídos de sementes, frutos, flores, folhas, caules e raízes (ASBAHANI *et al.*, 2015; DE SOUZA MOURA *et al.*, 2020).

2.4.1.1. Técnicas de obtenção de óleos essenciais

A obtenção destes derivados vegetais é um quesito de alto interesse para diferentes indústrias levando ao desenvolvimento de diferentes técnicas de extração. Há várias técnicas de extração de óleos essenciais, tanto tradicionais quanto modernas (SUNDAR; PARIKH, 2023). Os métodos convencionais incluem hidrodestilação, extração com vapor de água, enfleurage, extração com solvente orgânico e prensagem a frio. Enquanto isso, as técnicas modernas compreendem a extração de fluidos supercríticos, líquidos de extração subcríticos como H₂ e CO₂, extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas, extração por micro-ondas sem solvente, hidrofusão por micro-ondas e gravidade (ASBAHANI *et al.*, 2015). Neste trabalho específico, a hidrodestilação e o arraste a vapor foram os métodos usados para a obtenção dos óleos essenciais de estudo.

A hidrodestilação é um processo usado para extrair óleo essencial de plantas aromáticas usando vapor saturado à pressão atmosférica (ÁLVAREZ; MELÉNDEZ; COSÍO, 2012). Nesse processo, o material vegetal moído, triturado ou inteiro entra em contato direto com a água, sendo colocados em uma manta térmica acoplada ao aparelho de destilação. A mistura é então aquecida e o vapor de água gerado passa pelas paredes celulares do material vegetal, liberando os óleos essenciais. Esses óleos são transportados para a parte superior do hidrodestilador pelo vapor circundante, que também os protege do superaquecimento. A mistura de óleo essencial/vapor é então condensada à temperatura ambiente no condensador e separada da água em um decantador dinâmico pela diferença de densidade e viscosidade entre o óleo e a água (ÁLVAREZ; MELÉNDEZ; COSÍO, 2012). O processo de destilação a vapor é semelhante ao da hidrodestilação, exceto pelo fato de que o material vegetal é colocado em um recipiente separado e o vapor superaquecido é gerado em outro recipiente (ASBAHANI *et al.*, 2015).

A Farmacopeia Europeia, em sua terceira edição, recomenda a execução da técnica de extração de óleos essenciais pelo sistema Clevenger, pois permite a determinação dos rendimentos dos óleos essenciais e a reciclagem dos condensados em um sistema de *cohogabe*. As vantagens do processo de hidrodestilação são que ele é realizado abaixo de 100 °C e não são usados solventes orgânicos, razão pela qual é considerado um processo econômico e ecológico. No entanto, o longo período de extração (3 a 6 h),

sobreaquecimento e degradação e/ou reação de compostos químicos dos óleos essenciais são os limitantes da técnica de hidrodestilação (ÁLVAREZ; MELÉNDEZ; COSÍO, 2012).

2.4.1.2. Métodos de caracterização química dos óleos essenciais

Diferentes estudos demonstraram que fatores ambientais (temperatura, precipitações, sazonalidade), geográficos, genéticos e agronômicos (fertilizantes, tipo de solo, infestação por insetos) podem influenciar a composição dos óleos essenciais de uma planta, de modo que a diversificação química pode ser identificada em derivados de uma mesma espécie (ALVES *et al.*, 2016; SAMPAIO *et al.*, 2016). Para determinar a composição química dos óleos essenciais, são utilizadas técnicas de cromatografia gasosa (CG) e espectrofotometria de massa (EM). Esses métodos permitem a identificação e a medição precisa das porcentagens relativas dos compostos presentes na fração volátil (ÁLVAREZ; MELÉNDEZ; COSÍO, 2012).

A CG opera separando uma ou mais misturas de compostos com base em suas propriedades de polaridade, pressão de vapor e volatilidade (STAUFFER; DOLAN; NEWMAN, 2008). O equipamento utilizado é composto por uma fonte de gás, um sistema de injeção, um sistema de forno, uma coluna cromatográfica, um sistema de detecção e um sistema de registro. O gás de arraste, como hidrogênio, nitrogênio ou hélio, é usado porque tem adsorção mínima. Há dois tipos de colunas cromatográficas: colunas empacotadas e colunas capilares. Em geral, durante a análise, uma alíquota da amostra é injetada e arrastada por um fluxo de gás inerte (fase móvel) a uma temperatura alta, que é controlada por um forno e é direcionada para uma coluna cromatográfica (fase estacionária). A separação dos componentes da mistura é produzida por meio de um mecanismo de absorção gás-sólido ou partição gás-líquido ou uma combinação de ambos os mecanismos. Por fim, as substâncias separadas passam pelo sistema de detecção e pelo sistema de registro, permitindo uma análise precisa (STAUFFER; DOLAN; NEWMAN, 2008).

2.5. BIOPROSPECÇÃO ANTIFÚNGICA DE MATERIAL VEGETAL PROCEDENTE DO BRASIL

O Brasil é considerado um dos principais centros de biodiversidade no mundo, sendo o habitat de diversas populações florísticas, o que fornece uma importante fonte de

diferentes compostos naturais biologicamente ativos. As estruturas químicas presentes nestes derivados vegetais podem se tornar em proeminentes fontes de modelos moleculares para o desenvolvimento de novos produtos como medicamentos, agroquímicos, cosméticos, fragrâncias e suplementos alimentares (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018).

2.5.1. ESPÉCIES VEGETAIS NATIVAS DO BRASIL

No litoral norte do Estado do Rio de Janeiro, encontra-se localizado uma importante unidade de conservação federal com grande relevância biológica e geológica, o Parque Nacional de Restinga de Jurubatiba - PNRJ (MISUMI *et al.*, 2018). Desde a década de 1980, o Parque tem sido alvo de diferentes estudos biológicos, voltados principalmente na bioprospecção de metabolitos secundários vegetais com propriedades ativas. Este complexo de biodiversidade é caracterizado por apresentar condições ambientais extremas como elevadas temperaturas, fluxo contínuo de vento, altas concentrações de salinidade e solos carentes de nutrientes (MELO JÚNIOR; BOEGER, 2015). Tais aspectos ambientais fazem com que as espécies das formações florísticas mais próximas ao litoral sobrevivam em condições severas e com alta limitação nutricional. Estas propriedades são determinantes na fisiologia de cada fitocomunidade (MELO JÚNIOR; BOEGER, 2015), e podem influenciar na produção de metabolitos secundários como resposta de sobrevivência neste ambiente (COGLIATTI-CARVALHO, 2002). Portanto, o estudo da bioprospecção antifúngica de extratos vegetais e óleos essenciais dessas plantas é visto como uma estratégia que pode contribuir para a busca de alternativas para o controle sustentável dos fitopatógenos que devastam as culturas agrícolas e causam problemas de saúde. No presente estudo, duas espécies procedentes do PNRJ foram estudadas sobre o potencial antifúngico contra o fungo *Thielaviopsis ethacetica*.

2.5.1.1. *Annona acutiflora*

Annona acutiflora, comumente chamada de "araticum" ou "pau-de-guiné", é uma espécie endêmica da Mata Atlântica brasileira (LOBÃO; ARAUJO; KURTZ, 2005). Especificamente, essa espécie de árvore está presente principalmente nos estados da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro (JBRJ, 2020). Desde um conhecimento etnobotânico, esta

espécie tem sido tradicionalmente utilizada para produção artesanal, fins religiosos e alimentícios (FERNANDEZ *et al.*, 2021). Atualmente, o potencial biológico dessa planta tem sido pouco explorado, o que motiva sua bioprospecção em agentes antifúngicos. Folly *et al.* (2021) descreveram o potencial larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* no terceiro estágio a partir de uma nanoemulsão contendo o óleo essencial foliar desta espécie, extraído por hidrodestilação. Em um trabalho recente de nosso grupo de pesquisa, foi relatado que o extrato orgânico da fração butanólica das folhas de *A. acutiflora* apresenta atividade fungistática sobre esporos do fungo *T. ethacetica* a uma concentração de 6 mg/mL (DUARTE *et al.*, 2022). Além disso, nesse estudo foi possível identificar que esse extrato vegetal não apresentou toxicidade severa sobre as abelhas *Apis mellifera*, importantes polinizadores em agroecossistemas (DUARTE *et al.*, 2022).

2.5.1.2. *Xylopia ochrantha*

Xylopia ochrantha Mart. (*X. ochrantha*) é uma planta pertencente à família Annonaceae e é comumente conhecida como imbiú-prego, coração e pindaíba (ARAÚJO *et al.*, 2019; VIANA; ESTEVES, 2023). Essa espécie arbórea endêmica da Mata Atlântica brasileira tem ocorrências nos Estados da Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo e Rio de Janeiro (FLORA DO BRASIL 2020, 2020; VIANA; ESTEVES, 2023). Albuquerque (2013) identificou a atividade bactericida do óleo essencial das folhas de *X. ochrantha*. Além disso, o mesmo autor identificou a atividade antioxidante do óleo essencial e do extrato dessa planta, apresentando valores acima de 0,40 mmol TE/g (ALBUQUERQUE, 2013). Posteriormente, a nanoemulsão contendo o óleo essencial foliar desta espécie apresentou resultados promissores em vetores de grande interesse em saúde pública, especificamente moluscos do gênero *Biomphalaria*, hospedeiros intermediários de agentes etiológicos da esquistossomose (ARAÚJO *et al.*, 2019). Neste trabalho, foi relatado que a referida nanoemulsão apresentou uma concentração letal LC₅₀ de 50,91 ppm em 24 h contra o caramujo *Biomphalaria glabrata*. Ainda, Viana *et al.* (2023) determinaram que a nanoemulsão do óleo essencial de *X. ochrantha* apresentou uma LC₅₀ de 192,5 ppm em 48 h sobre o terceiro estágio do mosquito *Aedes aegypti*, o agente causador da dengue. À diferença da atividade bactericida identificada, (VIANA; ESTEVES, 2023) não relataram atividade fungicida relacionadas aos derivados vegetais da *X. ochrantha*.

2.5.2. BIOPROSPECÇÃO ANTIFÚNGICA DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS

Diversos estudos afirmam que a atividade antifúngica dos óleos essenciais depende de sua composição química, especialmente de suas substâncias majoritárias (SCARIOT *et al.*, 2020), embora outros estudos também relatem um efeito sinérgico. Por exemplo, foram realizados estudos para avaliar a atividade de fitoquímicos voláteis em fungos patogênicos de plantas, como o realizado por Scariot *et al.* (2020), no qual testaram 1,8-cineol, citral, limoneno, linalol, mirceno e timol no crescimento micelial dos fungos *Colletotrichum fructicola* e *Colletotrichum acutatum*. Garcia *et al.* (2008) estudaram o efeito do citral, citronelal, L-carvona, isopullegol e α -pineno sobre os fungos *Fusarium subglutinans f.sp. ananas*, *Colletotrichum musae* e *Colletotrichum gloeosporioides*, ao passo que Feng *et al.* (2023) avaliaram o potencial antifúngico do cinamaldeído contra fungos patogênicos de plantas das espécies do gênero *Rhizoctonia*. Portanto, a estratégia de empregar e avaliar o potencial de compostos voláteis, como o cinamaldeído, em *Thielaviopsis ethacetica* mostra-se uma alternativa viável.

Particularmente, o cinamaldeído ou 3-fenil-2-propenaldeído é um aldeído aromático e o principal constituinte do extrato e do óleo essencial da canela (*Cinnamomum verum*) e de outras espécies de *Cinnamomum* (FANG *et al.*, 2021). O odor e o sabor da canela fazem dela um composto frequentemente usado para realçar ou preservar o aroma dos alimentos. Essas substâncias são comumente reconhecidas como materiais seguros aprovados para uso em alimentos pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos - FDA (FANG *et al.*, 2021).

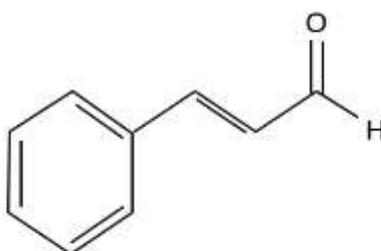


Figura 6 - Estrutura química do cinamaldeído. **Fonte:** Elaboração própria adaptada de Jardim *et al.* (2018).

O cinamaldeído é um composto com ampla atividade biológica, incluindo a antibacteriana (FENG *et al.*, 2023), antifúngica (BADR; BADAWY; TAKTAK, 2022; FENG *et al.*, 2023), antiviral (HAYASHI *et al.*, 2007), inseticida (JARDIM *et al.*, 2018), entre outras. No entanto, a volatilidade intrínseca do cinamaldeído e sua baixa solubilidade limitam completamente sua aplicação e eficácia biológica, de modo que os processos de emulsificação têm sido favoráveis para seu estudo e aplicação biotecnológica (FENG *et al.*, 2023; OTONI *et al.*, 2014). Entretanto, Feng *et al.* (2023) afirmaram que, apesar da conhecida atividade fungicida do cinamaldeído, poucos estudos se concentraram no tratamento de doenças fúngicas agrícolas por meio de biotecnologias.

2.5.3. BIOPROSPECÇÃO ANTIFÚNGICA DE UMA ERVA AROMÁTICA

Cymbopogon citratus (DC.) Stapf (*C. citratus*), conhecida no Brasil como capim-limão, capim-cedreão, capim-santo, capim-cidreira, é uma erva amplamente utilizada em áreas tropicais. Sua origem remonta ao continente asiático, mas foi amplamente difundida na África e na América (FURLAN *et al.*, 2010; HE *et al.*, 2023; MANVITHA; BIDYA, 2014; SHAH *et al.*, 2011). Essa planta perene é caracterizada por um rizoma curto e cresce em aglomerados densos que podem ter cerca de 1,8 m de altura e 1,2 m de largura. *C. citratus* é uma planta aromática amplamente cultivada para a produção de óleo essencial com rendimentos entre 1 e 2,5% (FURLAN *et al.*, 2010). Seus compostos voláteis são usados para a síntese de vitamina A, fabricação de sabão e fragrância (SHAH *et al.*, 2011).

Do ponto de vista etnofarmacológica, a erva de capim-limão tem sido usada para diferentes fins de acordo com o país, especialmente no continente americano. Por exemplo, na Argentina, a infusão das folhas dessa planta é ingerida oralmente com mate como remédio para dor de garganta e como agente emético (FILIPOV, 1994), enquanto no Brasil esse chá é usado como anti-inflamatório, analgésico ou antiespasmódico (Furlan *et al.* 2009). Já a infusão quente de folhas secas da erva é ingerida para reumatismo, hipotensão e resfriados em Cuba (CARBAJAL *et al.*, 1989). Enquanto nos Estados Unidos, há relatos de que comunidades indígenas de origem oriental em Minnesota usam o extrato aquoso da planta inteira topicamente para curar feridas e fraturas (SPRING, 1989). Por outro lado, estudos científicos compilam um amplo espectro de propriedades biológicas dessa erva, entre as quais antibacteriana, antibiótica, anti-inflamatória, antimalárica, antioxidante, hipoglicêmica e antifúngica (MANVITHA; BIDYA, 2014; SHAH *et al.*, 2011). A atividade antifúngica dos

derivados vegetais do *C. citratus*, particularmente em fungos fitopatogênicos tem sido amplamente estudada durante as últimas décadas (HE *et al.*, 2023; KAMSU *et al.*, 2019; MATASYOH *et al.*, 2011; TZORTZAKIS; ECONOMAKIS, 2007).

A composição do óleo essencial de *C. citratus* é caracterizada por terpenos, álcoois hidrocarbonetos, cetonas, ésteres e principalmente aldeídos. O óleo essencial é caracterizado por uma predominância de citral, um composto com forte odor de limão. O citral é uma mistura de dois aldeídos monoterpênicos estereoisoméricos, o isômero transgeranial (α -citral ou citral A) com alta predominância (40-62%) do óleo sobre o isômero cisneral (β -citral ou citral B) (25-38%). Entretanto, a composição química desse derivado pode ser influenciada pela localização geográfica, fatores fitogeográficos e microclimáticos (HE *et al.*, 2023; SHAH *et al.*, 2011). A Quadro 1 apresenta uma compilação das variações dos principais compostos majoritários do óleo essencial em diferentes localizações geográficas na Ásia, Europa, África e Américas. Nesta compilação observam-se inclusive diferenças em derivados coletados em um mesmo estado do território brasileiro.

Quadro 1 - Recopilação de estudos de composição química do óleo essencial de *C. citratus*

Origem da espécie (Cidade, País)	Parte da planta / técnica de extração	Componentes majoritários	Espécie alvo	Referência
Manchester, Reino Unido	Folhas / Hidrodestilação	Geranial (40,79%), Neral (31,85%), Limoneno (4,39%)	Fungos <i>Colletotrichum coccodes</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> e <i>Aspergillus niger</i>	(TZORTZAKIS; ECONOMAKIS, 2007)
Douala-Cameroon	Folhas / Hidrodestilação	Linalol acetate (41,29%), geraniol (32,15%), 2,6-Dimethyl-2-heptanol (11,4%)	Fungos <i>Colletotrichum musae</i> , <i>Fusarium incarnatum</i> and <i>F. verticillioides</i>	(KAMSU <i>et al.</i> , 2019)
Kakamega, Kenya	Materiais vegetais inteiros/ Hidrodestilação	Geranial (39,53%), Neral (33,31%), Mirceno (11,41%)	Fungos <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus niger</i> and <i>Aspergillus fumigatus</i>	(MATASYOH <i>et al.</i> , 2011)
Yuxi, China	Folhas / Destilação a vapor	Geranial (38.7%), Neral (29.8%), Selina-6-en-4-ol (12,13%)	<i>Fungo Botrytis cinerea</i>	(HE <i>et al.</i> , 2023)
Kunming, China		Neral (24.2%), Selina-6-en-4-ol (21,8%), geranial (15,5%)		
Bogotá, Colômbia	Folhas / Destilação a vapor	Geranial (41,88%), Geraniol (28,13%); Felandreno (16,16%)	Bacterias <i>Xanthomonas axonopodis</i> e <i>Ralstonia</i> spp.	(GODOY <i>et al.</i> , 2021)
Belo Horizonte, Brasil	Folhas / Hidrodestilação	Geranial (49,63%), Neral (22.76%), Mirceno (7,29%)	ND	(BARBOSA <i>et al.</i> , 2008)
Viçosa, Brasil		Geranial (50,18%), Neral (31,53%), Mirceno (1,59%)		
Itumirim, Minas Gerais, Brasil	Folhas / Hidrodestilação	Geranial (46,32%), Neral (31,28%), Mirceno (12,90%)	Fungos <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i>	(GONÇALVES, <i>et al.</i> , 2015)
Botucatu, São Paulo, Brasil	Folhas / Hidrodestilação	Geranial (46,32%), Neral (31,28%), B-mirceno (12,90%)	Camundongos (ensaios de toxicidade aguda, atividade ansiolítica e anticonvulsivante)	(BLANCO <i>et al.</i> , 2009)
Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil	Folhas / Destilação a vapor	Geranial (40,8%), Neral (36,3%), β -mirceno (13,2%).	Fungos <i>Colletotrichum acutatum</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	(ANTONIOLI <i>et al.</i> , 2020)

ND: Não determinado

2.6. BIOTECNOLOGIAS APLICADAS A BIOPRODUTOS

Alguns óleos essenciais têm reconhecidas propriedades antioxidantes e antifúngicas, o que os torna extremamente valiosos para os setores farmacêutico e cosmético (ASBAHANI *et al.*, 2015). No entanto, eles têm limitações para o controle da degradação de frutas devido à sua hidrofobicidade, termossensibilidade, alta volatilidade e sensibilidade à radiação UV. Com o tempo, essas características podem reduzir seu potencial biológico (ANTONIOLI *et al.*, 2020). Para resolver esse problema, biotecnologias como emulsificação, microencapsulação e incorporação em biofilmes e revestimentos comestíveis foram desenvolvidas como estratégias viáveis para preservar alimentos e materiais orgânicos de interesse industrial usando óleos essenciais (HUANG *et al.*, 2021).

2.6.1. EMULSIFICAÇÃO

A emulsificação a escala micro e nanométrica surgiram como uma alternativa inovadora para preparar biopesticidas contendo ingredientes ativos insolúveis em água. Tradicionalmente, os solventes orgânicos eram usados para obter concentrados emulsionáveis, mas com as novas técnicas de dispersão coloidal, pode-se melhorar a estabilidade, reduzir a toxicidade e eliminar a inflamabilidade das formulações de biopesticidas (PASCUAL-VILLALOBOS *et al.*, 2019). De acordo com a fase contínua ou dispersante que contém as gotículas dispersas, as emulsões podem ser óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O) (Figura 7a) (SAFAYA; ROTLIWALA, 2020). Uma emulsão de óleo em água é uma mistura de dois líquidos imiscíveis estabilizados por um agente emulsificante. Essas soluções podem ser formadas espontaneamente ou por fatores mecânicos, como a agitação. As emulsões estáveis podem durar longos períodos, mas sua estabilidade pode ser afetada por fatores como a adição de outra substância, a inativação do surfactante, o aquecimento ou o congelamento da solução (DONSÌ; FERRARI, 2016).

Os três sistemas de dispersões coloidais mais utilizados são emulsão, microemulsão e nanoemulsão. Estes sistemas se diferenciam entre tamanho do diâmetro das gotas e a estabilidade termodinâmica. As emulsões apresentam uma estabilidade metaestável com um diâmetro médio de gotículas acima de 200 nm. As microemulsões contêm gotículas de

óleo acima de 100 nm com estabilidade termodinâmica estável enquanto as nanoemulsões apresentam minúsculas gotículas redondas que medem entre 20 e 200 nm e são termodinamicamente metaestáveis (MCCLEMENTS, 2007). As nanoemulsões podem permanecer estáveis devido às forças repulsivas entre as partículas. Em geral, ao revestir as gotículas de óleo com os surfactantes, uma fina camada de água é formada à medida que elas se aproximam umas das outras. As cargas equivalentes da camada de surfactante fazem com que as gotículas se repelem, estabilizando a quebra do filme de gotículas e impedindo que elas se coalesçam (SAFAYA; ROTLIWALA, 2020).

Na formulação de nanoemulsões, os agentes emulsificantes ou tensoativos (surfactantes) tem um papel relevante. Os tensoativos são substâncias bastante peculiares que apresentam a função de diminuir a tensão interfacial e estabilizar o sistema evitando a ocorrência de fenômenos de instabilidade (MCCLEMENTS; RAO, 2011). Há quatro tipos de surfactantes: catiônicos (e.g. sais de amônio quaternário), aniônica (e.g. estearato de sódio), anfotéricos e não iônicos (e.g. polisorbato 80 ou Tween 80 e Span). Os surfactantes são classificados de acordo com o equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) das diferentes regiões de polaridade de suas moléculas (MUSTAFA; HUSSEIN, 2020). Há uma escala sem dimensão para determinar o EHL que varia de 0 a 20. Por exemplo, valores de EHL abaixo de 9 são para agentes não iônicos lipofílicos, enquanto valores acima de 11 são para agentes hidrofílicos (SCHRAMM; STASIUK; MARANGONI, 2003). Em geral, é recomendável formular nanoemulsões para fins de desenvolvimento de biopesticidas usando emulsificantes não iônicos, pois eles são menos afetados pela força iônica e pelo pH (MUSTAFA; HUSSEIN, 2020). Para garantir a estabilidade da dispersão, é fundamental usar tensoativos com um equilíbrio de EHL acima de 11 e 16, respectivamente, e evitar processos desestabilizadores, como formação de creme, coalescência ou floculação de gotículas de ingrediente ativo (MUSTAFA; HUSSEIN, 2020; PASCUAL-VILLALOBOS *et al.*, 2019).

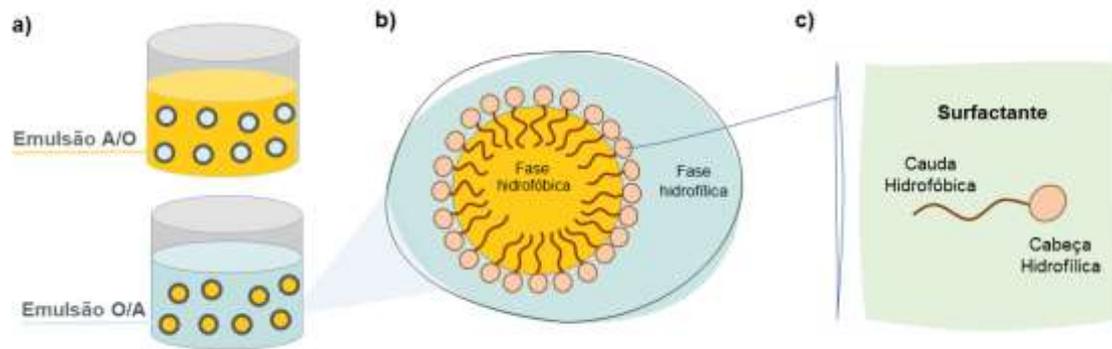


Figura 7 - Diagrama esquemática de emulsões. a) Emulsões óleo em água (O/A) e emulsões (A/O); b) Elementos de fases de uma nanoemulsão; c) descrição gráfico de um tensoativo (surfactante). **Fonte:** Elaboração própria adaptada de Mustafa e Hussein (2020) e Oliveira (2008).

As emulsões podem ser formuladas por técnicas de alto aporte de energia e baixo aporte de energia (PASCUAL-VILLALOBOS *et al.*, 2019). Nas técnicas de alto aporte energético, a mistura de emulsão é submetida a forças externas com alta entrada de energia por meio de equipamentos especializados, como homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores e ultrassônicos, que quebram gotículas maiores em gotículas menores. Os métodos de dissipação de baixa energia incluem emulsificação espontânea, composição de inversão de fase, temperatura de inversão de fase, diluição de microemulsão e emulsificação de fase D (SAFAYA; ROTLIWALA, 2020). No processo de inversão de fase, a fase contínua (dispersante) é gradualmente adicionada à fase dispersa (óleo e surfactantes) sob agitação. A tensão interfacial é reduzida no ponto em que ocorre a inversão de fase, exercendo um baixo gasto de energia (SAFAYA; ROTLIWALA, 2020).

2.6.1.1. Análises de caracterização de nanoemulsão

As formulações emulsionadas apresentam uma ampla variedade de propriedades físicas, como tamanho da gota, transparência, viscosidade, homogeneidade e estabilidade. Essas características podem ser caracterizadas por métodos analíticos, como dispersão dinâmica de luz (DLS), dispersão de nêutrons a baixo ângulo, viscosidade, microscopia de força atômica e potencial zeta (MUSTAFA; HUSSEIN, 2020). A análise DLS tem se mostrado bastante útil e amplamente utilizada para a medição do tamanho médio e da distribuição de

gotículas. As amostras de nanoemulsões geralmente são diluídas com água milli-Q para evitar a dispersão múltipla devido à agregação por interação eletrostática. Outra propriedade de interesse durante o processo de caracterização da nanoemulsão é o índice de polidispersividade (IPD). O IPD mostra a distribuição homogênea, indicando a estabilidade do sistema. Para uso agrícola, um valor de IPD inferior a 0,5 é aceitável porque expressa uma boa uniformidade do diâmetro das gotículas (MUSTAFA; HUSSEIN, 2020).

Além disso, por meio de um zetasizer, é possível determinar o potencial zeta de uma nanoformulação. O potencial zeta corresponde à diferença de potencial entre a superfície dos íons fortemente ligados à superfície das gotículas em uma região neutra da formulação. As nanoemulsões com um valor potencial superior a 30 mV em módulo superam as forças atrativas de Van der Waals, o que evita sua desestabilização por floculação (MÜLLER; JACOBS; KAYSER, 2001; TEO *et al.*, 2015).

2.6.1.2. Emulsificação aplicada ao estudo de bioantifúngicos agrícolas

Há uma ampla variedade de estudos objetivando a aplicação de óleos essenciais como alternativas para controlar fungos degradadores. Cruz *et al.* (2018) elaboraram nanoemulsões por meio do método de emulsificação espontânea usando diferentes quimiotipos do OE de *Lippia gracilis*. A caracterização física desta formulação considerou o tamanho das partículas, o potencial zeta e o índice de polidispersividade (PDI). Uma nanoemulsão de um quimiotipo do óleo de *L. gracilis* demonstrou inequivocamente uma potente atividade fungicida *in vitro* e foi altamente eficaz no controle da hemorragia do caule do coqueiro causada por *Thielaviopsis paradoxa*. Além disso, a aplicação da nanoemulsão não afetou a taxa fotossintética, a transpiração instantânea, a condutância estomática e o déficit de pressão de vapor que são típicos das espécies de árvores estudadas (CRUZ *et al.*, 2018). A emulsificação surge como uma solução para a aplicação de óleo essencial em produtos de madeira que exigem sanitização. Fang *et al.* (2021) relatam que as emulsões contendo cinamaldeído permitem a proteção do derivado da planta contra a volatilização e facilitam a aplicação em superfícies como a madeira. Por outro lado, uma nanoemulsão de cinamaldeído produzida pelo método de emulsificação apresentou promissores resultados de atividade antifúngica sobre os fungos filamentosos *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia*

cerealis, *Gaeumannomyces graminis*, agentes etiológicos da praga da bainha do arroz, da praga da bainha do trigo e das doenças da micose do trigo, respectivamente (FENG *et al.*, 2023).

2.6.2. MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação é uma tecnologia que se mostra viável para preservar a qualidade de substâncias altamente sensíveis, como os óleos essenciais. Essa tecnologia é amplamente utilizada nos setores farmacêutico, cosmético, alimentício e de produtos de limpeza, entre outros (DEVI *et al.*, 2017; DEVI; KAKATI, 2013). Essa técnica de microencapsulação tem sido considerada viável para superar as diferentes limitações dos óleos essenciais para sua aplicação em alimentos. A microencapsulação é um método de revestimento ou aprisionamento de um material ou de sua mistura dentro do reservatório de um material ou sistema (PIACENTINI *et al.*, 2013). A substância que é revestida é conhecida como "ativo" ou "núcleo". Enquanto isso, o material de revestimento é conhecido como "material de parede" ou matriz e é comumente aplicado em solução ou suspensão para permitir o encapsulamento do núcleo. Esse material de parede deve ter propriedades ideais de barreira e formação de filme e não deve se dissolver ou reagir com a substância ativa a ser encapsulada (NAPIÓRKOWSKA; KUREK, 2022).

A microencapsulação de óleos essenciais tem as vantagens de proteger os óleos essenciais de fatores ambientais (luz, oxigênio, umidade e calor) que afetam sua estabilidade, melhora a solubilidade e a biodisponibilidade, proporcionando uma liberação controlada aprimorada, e aumenta o tempo da atividade biológica. Além disso, o encapsulamento de derivados voláteis de plantas reduz o sabor e o odor fortes que podem afetar os aspectos organolépticos dos alimentos e evita a interação e a mistura dos óleos com outros ingredientes alimentícios (NAPIÓRKOWSKA; KUREK, 2022).

A morfologia das microcápsulas dependerá do método de encapsulamento, do tipo de ativo e do material da parede utilizado. O diâmetro médio das micropartículas varia entre 100 e 500 μm . Em um sistema de encapsulamento, é possível distinguir dois tipos de partículas: microesferas e microcápsulas. Nas microesferas, o ingrediente ativo ou núcleo é misturado com o material da parede, como uma esponja, enquanto as microcápsulas atuam

como reservatório do ingrediente ativo, sendo revestidas pelo material encapsulante (FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008). A microencapsulação pode ser realizada por meio de métodos físicos como *spray-drying*, *spray-cooling*, extrusão, co-cristalização, leito fluidizado; métodos químicos: polimerização interfacial e inclusão molecular e métodos físico-químicos como: pulverização em agente de reticulação, separação por fase orgânica, envolvimento lipossômico e coacervação simples e complexa. No presente estudo foi realizada a técnica de coacervação complexa para a incorporação do óleo essencial com potencial antifúngico.

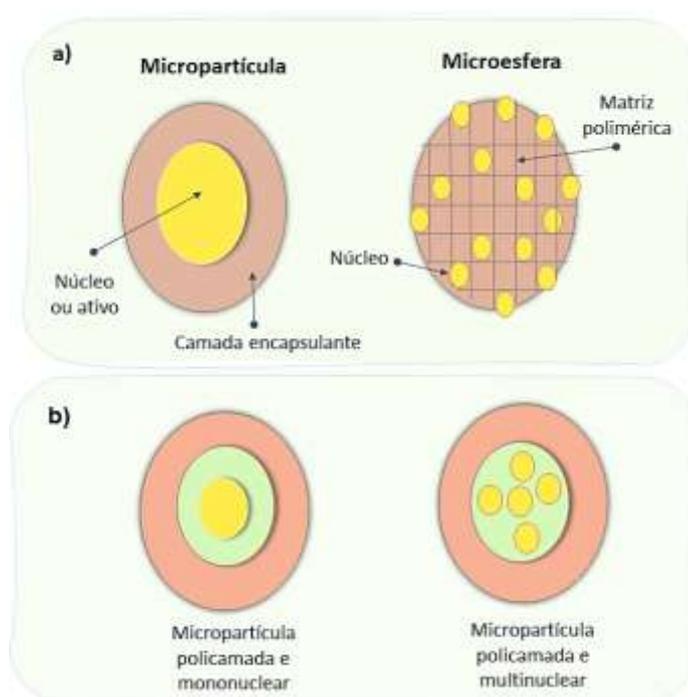


Figura 8 - Esquema de microencapsulação de óleos essenciais. a) Tipos de partículas obtidas por microencapsulação; b) morfologia de micropartículas. **Fonte:** Elaboração própria adaptada de Gonçalves (2016).

2.6.2.1. Coacervação complexa

A palavra coacervação vem do prefixo *co*, que se refere à fusão de partículas coloidais, e do latim *acervus*, que significa agregação (DEVI *et al.*, 2017). A coacervação consiste na separação do hidrocoloide de uma solução primária seguida da aglomeração em uma fase separada da fase líquida chamada coacervado. Essa técnica de microencapsulação é

classificada em coacervação simples e coacervação complexa. A coacervação simples consiste em adicionar um solvente a uma solução coloidal hidrofílica, o que resulta em duas fases, uma fase rica em moléculas coloidais e outra livre de coacervados. Enquanto isso, a coacervação complexa, um termo introduzido em 1940 por Bungenberg de Jong, é um fenômeno espontâneo no qual ocorre a separação de uma solução de macromoléculas contendo dois polímeros com cargas opostas em duas fases. A neutralização das cargas gera a formação de uma fase polimérica rica e uma fase aquosa. A coacervação complexa é comumente realizada usando uma proteína e um polissacarídeo como material de parede (LV *et al.*, 2014).

Em geral, a microencapsulação de material hidrofóbico por coacervação complexa envolve as seguintes etapas conforme mostra a Figura 9: (i) o material hidrofóbico é emulsificado em uma solução contendo uma proteína que será então adicionada a outra solução polimérica; normalmente, essa adição é realizada em temperatura acima do ponto de gelificação e em um pH acima do ponto isoelétrico da proteína; (ii) devido a interações de atração eletrostática entre os polímeros de carga oposta dentro da solução, ocorre a separação de duas fases líquidas, uma fase rica em polímero insolúvel e uma fase aquosa sem polímero; (iii) a fase rica em polímero é depositada em torno das gotículas do material hidrofóbico devido ao resfriamento controlado da solução abaixo da temperatura de gelificação; (iv) e o endurecimento da parede pela adição de um agente de reticulação para obter micropartículas duras e em camadas (NAPIÓRKOWSKA; KUREK, 2022).

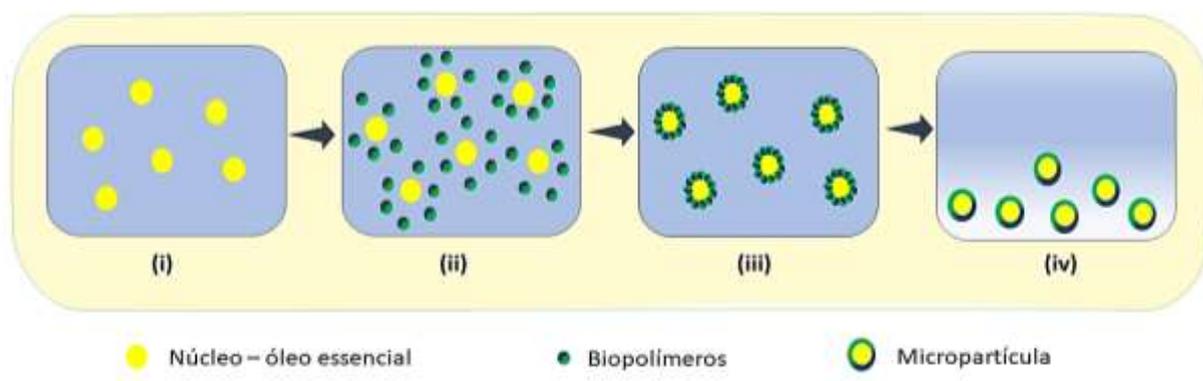


Figura 9 - Esquema do processo de formação de micropartículas por coacervação complexa. **Fonte:** Elaboração própria adaptada de Napiórkowska e Kurek (2022).

A coacervação complexa, por mais que seja um processo espontâneo, ocorre somente em condições muito específicas. O processo depende da densidade de carga dos polieletrólitos, da tensão superficial e da temperatura do sistema, além da dinâmica do sistema (agitação e resfriamento). Assim, um sistema de coacervação complexa é influenciado por parâmetros operacionais, como pH, proporção de biopolímero determinada pelo diferencial de carga, concentração de sólidos totais, concentração de fase dispersa, entre outros (PIACENTINI *et al.*, 2013). Para conhecer a interação de proteínas-polissacarídeos que permite sua associação para fins de coacervação, é necessário estudar o comportamento eletrostático dos biopolímeros. O diferencial de carga entre os biopolímeros expresso em termos de potencial zeta permite obter estequiometrias otimizadas de interação, o que leva à identificação do ponto ideal em que ocorre carga zero no sistema para coacervação. Esse modelo de interação proteína-polissacarídeo aponta que o complexo polimérico gerado pode ser solúvel ou insolúvel, dependendo da proporção da fração de massa entre os biopolímeros usados e o pH do sistema (TOLSTOGUSOV, 2002). A coacervação complexa se mostra uma técnica promissora de encapsulamento de óleos essenciais e outros princípios ativos para uma ampla gama de finalidades. O Quadro 2 apresenta uma compilação de estudos que empregam a coacervação complexa com biopolímeros de derivados de plantas.

Quadro 2- Estudos sobre microencapsulação por coacervação complexa

Polímero 1	Polímero 2	Proporção	pHc	Núcleo encapsulado	Aplicação	Referencia
Quitosana	Goma de Caju	1:1	-	OE de <i>Lippia sidoides</i>	Larvicida	(ABREU <i>et al.</i> , 2012)
Quitosana	k-carragenina	1:1	4,5	OE de <i>Pimenta dioica</i>	Antimicrobiana	(DIMA <i>et al.</i> , 2014)
Gelatina tipo B	Goma arábica	1:1	4,8	OE de Jasmine	ND	(LV <i>et al.</i> , 2014)
Gelatina tipo B	Goma arábica	1:1	4,0	OE de <i>Thymus vulgaris</i>	Antimicrobiana/ alimentos	(GONÇALVES, <i>et al.</i> , 2017)
Gelatina tipo B	Mucilagem de Chia	2:1	3,6	OE de <i>Origanum vulgare</i>	Não determinada	(HERNÁNDEZ-NAVA <i>et al.</i> , 2020)
Gelatina tipo B	Goma arábica	1:1				
Gelatina tipo A	Alginato de sódio	1:3,5	3,75	Vitamina C	Encapsulação de vitamina C	(DEVI; KAKATI, 2013)
Gelatina tipo B	Alginato de sódio	4:1	3,5	ND	ND	(SHINDE; NAGARSENKER, 2009)
Gelatina	Goma arábica	1:1 2:1	3,25 – 4,0	OE de Vetiver Óleo mineral óleo de amêndoa	ND	(PRATA; GROSSO, 2015)

OE: óleo essencial; pHc: pH de coacervação; ND: não determinado.

2.6.2.2. Biomateriais para encapsulação

A seleção do material de encapsulamento desempenha é um aspecto crítico no processo de microencapsulação, portanto, é necessário verificar as características de solubilidade, a porosidade, disponibilidade, custos de aquisição e a área de aplicação das micropartículas (BRASILEIRO, 2011). Em particular, os polímeros com densidades de carga elétrica opostas e solubilidade em meio aquoso são ideais para uso na coacervação complexa de ingredientes ativos, como óleos essenciais (DEVI *et al.*, 2017).

Um dos aspectos mais interessantes do estudo e do desenvolvimento de micropartículas é a inovação de materiais de parede por meio da aplicação de biopolímeros (DEVI *et al.*, 2017). Os biopolímeros podem ser obtidos a partir da síntese convencional por monômeros, microrganismos e fontes renováveis, como polissacarídeos e proteínas de origem vegetal e animal (Figura 10). A combinação de proteínas e polissacarídeos tem sido amplamente utilizada para o encapsulamento de ingredientes ativos por coacervação complexa. Saravanan e Rao (2010) afirmaram que os polissacarídeos de carga negativa, como carboximetilcelulose, pectina, acácia e alginato, são comumente usados em sistemas de coacervação junto com proteínas de carga positiva, como a gelatina. No presente estudo foi realizada uma triagem de diferentes biopolímeros com capacidade de encapsular derivados vegetais, incluindo quitosana, gelatina tipo A e tipo B, alginato (de alta e média viscosidade), goma arábica e proteína isolada de ervilha. No entanto, um sistema de coacervação de gelatina tipo B e alginato de sódio foi escolhido para o encapsulamento do óleo essencial com atividade promissora.

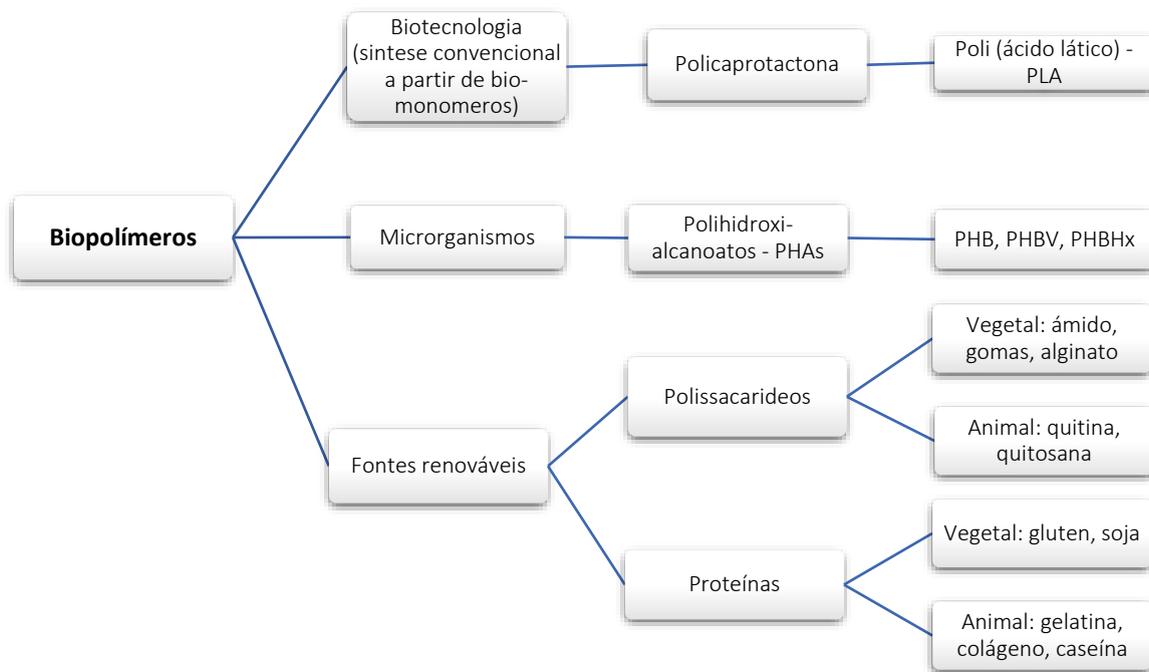


Figura 10 - Classificação de biopolímeros. **Fonte:** Elaboração própria com adaptações de Valero-Valdivieso, Ortegón e Uscategui (2013).

2.6.2.2.1. Alginato

Os alginatos são considerados polímeros biodegradáveis, biocompatíveis e seguros para os seres humanos (WANG *et al.*, 2023). Os alginatos são sais de ácido algínico, um biopolímero linear formado por unidades monoméricas de dois ácidos urônicos, ou ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G), que são ligados por 1 \rightarrow 4 ligações glicosídicas em três tipos de sequências poliméricas: Blocos M, blocos G e blocos MG (Figura 11). Esse biopolímero pode ser encontrado na parede celular das algas castanhas na forma de sal misto de sódio, potássio, cálcio e magnésio (COTTRELL; BAIRD, 1980). O ácido algínico é o polissacarídeo dessas algas pertencentes à classe *Phaeophyceae*, representando cerca de 40% da massa seca das algas. A produção comercial de alginato é realizada por extração alcalina (carbonato de sódio) da massa das algas *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria* spp., *Ascophyllum nodosum* e *Ecklonia* (DUTTON, 1988). A proporção de ligações M:G e a quantidade dos três segmentos poliméricos mudam de acordo com a fonte. Assim, os alginatos têm composição e estrutura polimérica diferentes, o que determina propriedades diferentes. Por exemplo, os alginatos com maior predominância de blocos G formam géis

mais frágeis e rígidos, enquanto os géis de alginato com maior proporção de blocos M são mais elásticos (COTTRELL; BAIRD, 1980).

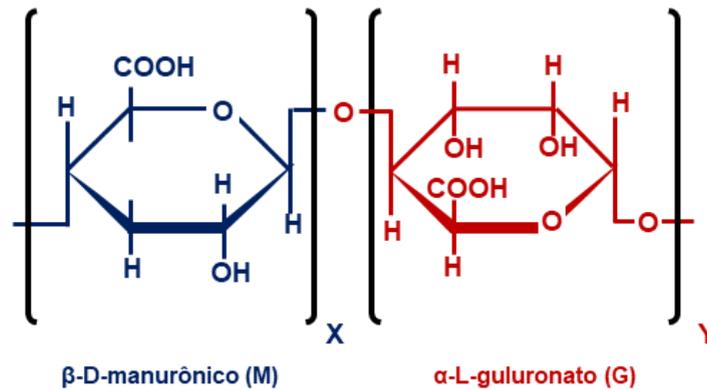


Figura 11 - Estrutura molecular do alginato. **Fonte:** Elaboração própria adaptada de Segato (2007).

A viscosidade é um dos parâmetros mais importantes dos alginatos. Esta propriedade é dependente das interações de ligação de hidrogênio entre os grupos polares da estrutura polimérica, depende da massa e da concentração do polímero, entre outros fatores. Assim, os alginatos comerciais podem ter viscosidades baixas, médias e altas (SEGATO, 2007). A viscosidade tende a diminuir com o aumento da temperatura até 40 °C, pois após esse ponto de temperatura ocorre a despolimerização parcial do alginato, levando à plastificação (COTTRELL; BAIRD, 1980). Além disso, um pH na faixa de 5 a 10 não interfere na viscosidade, enquanto uma solução de alginato em um pH abaixo de 4,5 aumenta sua viscosidade à medida que a solubilidade do ácido algínico livre diminui e, em um pH de 3, ele precipita (COTTRELL; BAIRD, 1980).

O alginato é um biopolímero usado nas áreas alimentícia, farmacêutica, de tratamento ambiental, médica e odontológica. Especialmente na área de alimentos, ele é usado como estabilizador de suspensões, emulsões e espumas, emulsificante, retentor de água e formador de gel. Diariamente, os alginatos são adicionados a produtos de panificação, temperos, molhos, bebidas, sobremesas em gel, sorvetes, entre outros, pelo que seu uso na encapsulação do óleo com fins de proteção de frutos é viável dentro o ponto de vista toxicológico (SEGATO, 2007).

2.6.2.2.2. Gelatina

A gelatina é uma proteína de alto peso molecular extraída da hidrólise do colágeno presente nos tecidos conjuntivos dos animais, como tendões e pele (CHAMBI, 2004). Figura 12 ilustra a distribuição molecular da gelatina. A gelatina se destaca como um biopolímero anfotérico, ou seja, tem uma carga positiva abaixo do ponto isoelétrico (pI) e uma carga negativa acima dele (DEVI; KAKATI, 2013). Dependendo do método de produção e do ponto isoelétrico (pI), é possível distinguir dois tipos de gelatina: tipo A e tipo B. A gelatina tipo A é obtida pela hidrólise parcial do colágeno em um ambiente ácido e tem um ponto isoelétrico entre pH 7 e 9. Já a gelatina tipo B é produzida a partir da hidrólise alcalina em um ambiente alcalino com um pI de 4,8 a 5,2 (CHAMBI, 2004). Como resultado de sua natureza anfotérica, propriedades de formação de gel e filmes termoreversíveis, a gelatina se tornou um biomaterial muito útil na formulação de micropartículas para uma ampla gama de processos (DHALL, 2013; DEVI; KAKATI, 2013).

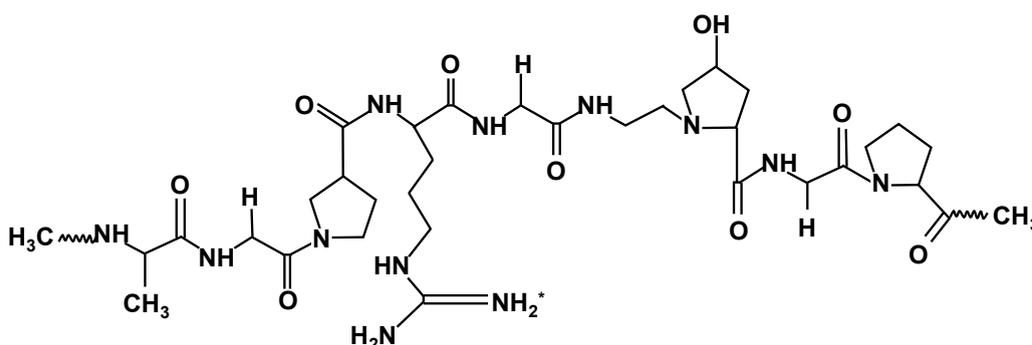


Figura 12 - Estrutura básica da molécula da gelatina. **Fonte:** Elaboração própria adaptada de Molina e Flórez-Castillo (2020).

2.6.3. REVESTIMENTOS DE FRUTOS

As frutas têm alta perecibilidade e estão expostas a manuseio inadequado, condições de armazenamento ineficientes e doenças causadas por microrganismos fitopatogênicos, especialmente fungos filamentosos (ZHAO *et al.*, 2020). Assim, várias tecnologias são implementadas no setor agroalimentar para estender a vida útil das frutas. Algumas dessas tecnologias de extensão do prazo de validade incluem radiação e irradiação de ozônio,

embalagem em atmosfera modificada, conservantes e aplicação de filmes e revestimentos comestíveis (KUMARI *et al.*, 2017).

Os revestimentos comestíveis são soluções ou emulsões formadoras de filme (EFF) com agentes espessantes que, quando aplicados em frutas, formam uma camada fina e uniforme que reduz os resíduos gasosos e a perda de água (GLICERINA *et al.*, 2022). Enquanto isso, um filme comestível é um material previamente moldado e seco em formato de uma folha sólida maleável a ser colocada sobre ou entre os frutos (OKCU; YAVUZ; KERSE, 2018). Os revestimentos comestíveis podem ser formados por aplicação direta na fruta por imersão ou pulverização, de acordo com as práticas da indústria alimentícia (BATISTA *et al.*, 2020; OKCU; YAVUZ; KERSE, 2018; OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2022). A aplicação de revestimentos comestíveis como estratégia inovadora na fase pós-colheita é viável porque protege a fruta das condições climáticas que induzem à deterioração, minimiza as reações químicas de amadurecimento e reduz a deterioração por microrganismos, permitindo o aumento da vida útil e o benefício econômico esperado do produto agrícola (BATISTA *et al.*, 2020; OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2022). Além disso, essa tecnologia emergente está se tornando cada vez mais atraente porque é capaz de usar biopolímeros que estão amplamente disponíveis no mercado, omitindo o uso de embalagens sintéticas de origem petroquímica que geralmente estão ligadas à poluição ambiental (OKCU; YAVUZ; KERSE, 2018).

Além disso, agentes antimicrobianos, como óleos essenciais e extratos de plantas, podem ser adicionados a esses biomateriais para aumentar a eficácia da tecnologia na prevenção da deterioração das frutas (DAS *et al.*, 2023; GRANDE TOVAR *et al.*, 2020; PERALTA-RUIZ *et al.*, 2020). Pesquisas demonstraram que os revestimentos a base de biopolímeros incorporando ou não óleos essenciais são uma estratégia promissora no tratamento pós-colheita de frutos. Por exemplo, revestimentos feitos de quitosana e óleo essencial de *Ruta graveolens* foram reportados como eficazes na prevenção da antracnose em frutas como mamão, peras Packham's Triumph e tomates (LANDI *et al.*, 2021; PERALTA-RUIZ; GRANDE TOVAR; *et al.*, 2020; PERALTA-RUIZ; TOVAR; *et al.*, 2020). Mello *et al.* (2020) informaram que a aplicação do revestimento comestível à base de nanocompostos de quitosana fúngica *in vitro* e em morangos artificialmente contaminados com fungos *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger* diminuiu a gravidade da infecção fúngica

durante o armazenamento da fruta. Frazão *et al.* (2017) identificaram que, em mangabas tratadas com revestimentos comestíveis feitos de quitosana e amido de mandioca incorporando óleo essencial de *Myrcia ovata*, houve uma redução na concentração de bactérias aeróbicas mesófilas totais, leveduras e bolores, e inibição de *Bacillus cereus* inoculado artificialmente na fruta.

Os revestimentos podem ser compostos principalmente de polissacarídeos, proteínas e lipídios (BATISTA *et al.*, 2020). Entre esses biopolímeros, os polissacarídeos, como alginato, quitosana, pectina e amido, destacam-se como excelentes materiais bioadesivos, capazes de se associar a óleos essenciais e com propriedades de liberação controlada e direcionada.

2.6.3.1. Fécula de mandioca

Um dos polissacarídeos que se tornou uma excelente matéria-prima no segmento de revestimentos, por ser um material renovável e amplamente disponível, com boas propriedades mecânicas e baixo custo, é o amido. O amido é um polissacarídeo de armazenamento reconhecido de legumes, cereais e tubérculos (DHALL, 2013). A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é um tubérculo cultivado em todas as regiões do Brasil com grande importância na nutrição humana e animal, bem como na geração de produtos processados, renda e emprego em muitas comunidades. Comparado ao milho e à batata amido, o amido de mandioca tem um preço mais baixo no mercado, o que é um aspecto favorável para a produção de filmes e revestimentos (CHIUMARELLI, 2011). O amido de mandioca consiste em 17% de amilose (um polímero linear de glicose, Figura 13a) e 83% de amilopectina (um polímero ramificado de glicose, Figura 13b). O amido é um material não uniforme que pode ser usado para a formação de filmes sem pré-tratamento (BANGYEKAN; AHT-ONG; SRIKULKIT, 2006). Os filmes e revestimentos de amido são inodoros, insípidos, incolores, não tóxicos, seguros, econômicos, isotrópicos e biodegradáveis, têm permeabilidade ao oxigênio e são usados em aplicações farmacêuticas e alimentícias (PARETA; EDIRISINGHE, 2006). Os revestimentos de amido de mandioca são obtidos pela gelatinização do amido na presença de água a 70 °C. A estrutura do grânulo de amido é desintegrada causada pelo aumento da temperatura, onde seus constituintes vazam e se transformam em substâncias gelatinosas para formar o gel de amido. Esse gel obtido ao

resfriar-se forma filmes devido às suas propriedades de recristalização (CHIUMARELLI, 2011).

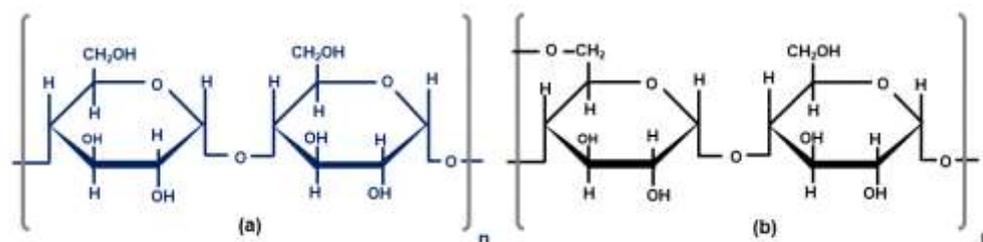


Figura 13 – Estrutura química de amilose (a), amilopectina (b). **Fonte:** Elaboração própria adaptada de Chiumarelli (2011).

No entanto, o amido sozinho não tem a capacidade de formar filmes com excelentes propriedades mecânicas, por isso é necessário adicionar um plastificante à solução (CHIUMARELLI, 2011). Os plastificantes têm a capacidade de aumentar a flexibilidade de revestimentos e filmes, mas, ao mesmo tempo, interferem na permeabilidade ao vapor de água e ao gás devido à sua hidrofiliabilidade e higroscopicidade (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2001). Assim, o tipo e a concentração do plastificante afetam as propriedades de barreira dos revestimentos à base de amido (CHIUMARELLI, 2011). Um dos plastificantes mais comumente usados para desenvolver revestimentos é o glicerol. O glicerol é um composto orgânico pertencente ao grupo dos álcoois, líquido a 25 °C, inodoro, viscoso, higroscópico e completamente solúvel em água e álcool. Comercialmente, é conhecido como glicerina, com pureza superior a 95% e é reconhecido como seguro para consumo humano (GRAS) desde 1959. A glicerina é classificada como um aditivo alimentar usado como espessante, estabilizador, agente gelificante e emulsificante (CHRISTOPH *et al.*, 2006).

2.7. ENSAIOS DE AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS VEGETAIS

2.7.1. ENSAIOS ANTIFÚNGICOS *IN VITRO*

De acordo com a literatura, distinguem-se diferentes ensaios antifúngicos *in vitro* para identificar o potencial fungicida de derivados vegetais. Os ensaios mais utilizados na aplicação de óleos essenciais são o ensaio de difusão em ágar, inibição micelial e o teste de

microdiluição. O teste de microdiluição é um método quantitativo utilizado para identificar concentrações fungistáticas e fungicidas de compostos voláteis. O teste é realizado em microplacas de 96 poços, onde são adicionados um volume de meio nutriente líquido, uma suspensão de conídios (na concentração que varia de 10^4 a 10^7 conídios mL^{-1}) e óleos essenciais diluídos em diferentes concentrações. As placas são então incubadas em condições específicas de temperatura, luz e tempo adequados ao crescimento médio de cada fungo (SOUZA *et al.*, 2020).

Além de determinar os valores da concentração inibitória mínima (CIM), que são as concentrações do composto onde não foi observado crescimento visível nas microplacas, o desenvolvimento de ensaios de triagem de alto rendimento (HTS) pode levar a resultados mais confiáveis. Para isso, o teste de microdiluição é realizado com adição de alguns indicadores de viabilidade celular, como 0,02% de resazurina (MONTEIRO *et al.*, 2012). O valor CIM é determinado observando a variação de cor nas microplacas. Esta variação colorimétrica pode ser observada qualitativamente por inspeção visual ou quantitativamente através da realização de medições de fluorescência (excitação 570 nm, emissão 615 nm) e medições de absorvância a 630 nm utilizando os corantes acima mencionados. Independentemente do teste e método utilizado, a concentração fungicida mínima (CFM) é determinada como a menor concentração na qual não se observa crescimento fúngico após a transferência ou nova semeadura de uma alíquota exposta ao OE em placas de meio nutriente em ágar (SAMPAIO *et al.*, 2020).

2.8. ASPECTOS DE QUALIDADE DE FRUTOS

Os aspectos físico-químicos relacionados à pós-colheita da banana e do tomate, duas frutas que serviram como modelos biológicos no presente trabalho, são discutidos nesta seção. Em toda a cadeia de produção agrícola, observa-se a redução da qualidade dos frutos, mas essas transformações degradativas são aceleradas durante a fase de pós-colheita. Produtos agrícolas como a banana e o tomate são altamente suscetíveis a danos físicos e químicos e fatores biológicos como doenças, pragas e distúrbios fisiológicos, sendo necessário implementar estratégias de conservação como sistemas de refrigeração e atmosfera controlada ou modificada, embalagens adequadas, entre outros (DHALL, 2013).

Por exemplo, a ausência de tratamento pós-colheita leva à degradação dos atributos do tomate, incluindo a redução da resistência ao manuseio e a redução dos sólidos solúveis e do teor de ácido cítrico (CASTRICINI *et al.*, 2004).

Os frutos, como estruturas vivas, após colhidos continuam realizando processos metabólicos importantes, como a respiração e transpiração, mesmo quando a planta é privada do suprimento de alimentos e água pela colheita. Depois que os cachos de banana são colhidos, os frutos passam por quatro estágios de desenvolvimento fisiológico: pré-climatérico, climatérico, maturação de consumo e senescência. O prolongamento do estágio pré-climatérico é fundamental para sua comercialização, pois nessa fase as bananas estão verdes, com textura rígida e baixa atividade metabólica (MEJIA, 2013). Além disso, os processos fisiológicos pós-colheita dos frutos são caracterizados pela liberação de um gás incolor chamado etileno (C_2H_4), considerado o hormônio do amadurecimento porque atua como iniciador e regulador dos processos de desenvolvimento e amadurecimento (THOMPSON; SUPAPVANICH; SIRISON, 2019; MEJIA, 2013). Particularmente, a síntese de etileno estimula a respiração, aumenta as pectinas solúveis, levando à redução da dureza do endocarpo, à degradação da clorofila, à redução de ácidos, fenóis e taninos e à despolimerização de polissacarídeos de alto peso molecular (ARCILA, 2002). Bananas, melões, mangas e tomates apresentam uma taxa média de síntese de etileno entre 1 e 10 $mg\ kg^{-1}\ h^{-1}$ a 20 °C (KADER, 2002).

Durante o processo de amadurecimento das frutas, uma série de modificações ocorre em nível celular dos vegetais, determinando sua qualidade pós-colheita (MEJIA, 2013). Por exemplo, durante o amadurecimento da banana e do tomate, ocorrem processos de amolecimento devido à degradação do epicarpo e do endocarpo por ação enzimática, degradação do amido, alterações de pigmentos devido à degradação da clorofila e à síntese de carotenoides, alterações de sabor, aroma, entre outros (FABBRI, 2009). Assim, é importante monitorar a perda de água como um fator fisiológico altamente crítico, juntamente com a caracterização físico-química dos frutos durante o processo de amadurecimento, pois esses determinam aspectos sensoriais, comerciais e de qualidade nutricional e o índice de maturidade. Entre os parâmetros mais estudados em frutas como

a banana e o tomate estão a cor, a textura, a acidez, o pH e os sólidos solúveis totais (YAO HOU *et al.*, 2023; DAS *et al.*, 2023; PERALTA-RUIZ *et al.*, 2020).

2.8.1. PERDA DE PESO FISIOLÓGICA

A perda de peso do fruto se deve à taxa de transpiração, na qual a água e as substâncias voláteis são difundidas devido a processos metabólicos por meio de estômatos, lenticelas, hidátodos e cutícula (KADER, 2002). Este aspecto fisiológico é crítico na avaliação de qualidade devido a que causa mudanças na aparência da fruta, como rugas, perda de turgidez e perda da qualidade da textura, o que pode levar à perda do valor comercial da fruta (MEJIA, 2013).

2.8.2. COR INSTRUMENTAL

É um dos indicadores mais importantes da maturidade dos frutos por ser uma medida funcional, rápida e prática, porém esta medida requer o acompanhamento de outras medições físico-químicas. As mudanças de cor durante o processo de amadurecimento do fruto são resultado do metabolismo da planta, em que alguns pigmentos são degradados, enquanto outros são promovidos por fatores genéticos, fenotípicos e ambientais da planta (THOMPSON; SUPAPVANICH; SIRISON, 2019; MEJIA *et al.*, 2013). A cor é um dos indicadores mais relevantes durante o processo de amadurecimento, pois as mudanças na coloração sugerem alterações na textura, no sabor e no aroma (THOMPSON; SUPAPVANICH; SIRISON, 2019).

A cor pode ser medida sensorialmente e instrumentalmente, sendo esta última útil no manejo pós-colheita de frutas. A cor instrumental de frutas pode ser estudada por meio do sistema ou espaço "Hunter Lab", também chamado de CIELAB, desenvolvido em 1976 pela Comissão Internacional de Iluminação (KULCU, 2018). A Figura 14 mostra que o sistema CIELAB é baseado em três coordenadas retangulares L^* , a^* , b^* que permitem definir a posição de uma cor em um sistema tridimensional (YAO-HOU *et al.*, 2022; PERALTA-RUIZ *et al.*, 2020). A coordenada acromática L^* representa a luminosidade, com uma escala de 0 a 100, em que o preto tem o valor 0 e o branco, o valor 100 (do escuro ao claro). A coordenada de cromaticidade a^* refere-se à quantidade de croma ou croma cromático, que corresponde

à faixa de cores entre verde (-) e vermelho (+) com valores que variam de -90 (verde) a +90 (vermelho). A coordenada de cromaticidade b^* refere-se ao intervalo de azul a amarelo com valores que variam de -90 (azul) a +90 (amarelo). A partir das coordenadas retangulares L^* , a^* e b^* , é possível determinar as coordenadas cilíndricas o índice de saturação ou pureza da cor conhecido como Cromo C^* (Veja Eq. 2), o ângulo Hue - Hue° ou matiz (Eq. 3), e a mudança total de cor ΔE (Eq. 4) (PERALTA-RUIZ *et al.*, 2020).

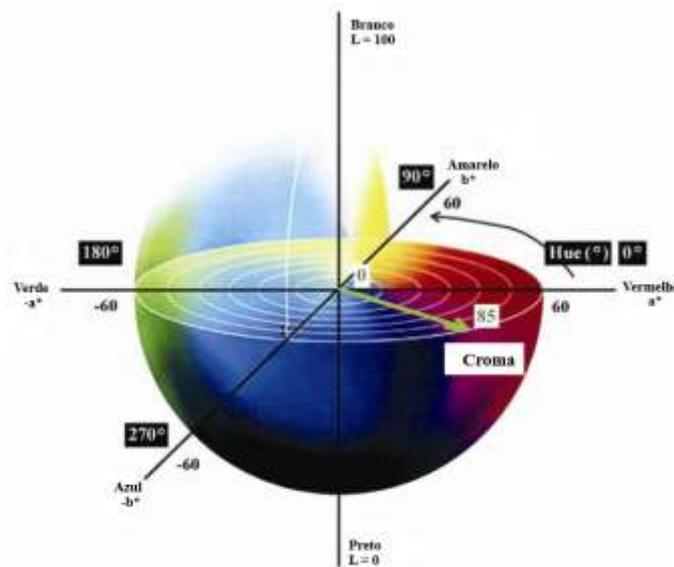


Figura 14 - Espaço de "HunterLab". **Fonte:** adaptada e traduzido de Kulcu (2018).

2.8.3. FIRMEZA

A firmeza ou resistência mecânica dos frutos é determinada pela forma de agrupamento dos componentes estruturais do fruto, que é verificada pelo comportamento reológico em sua superfície (CASTRO, 2003). Essa propriedade mecânica depende do estado de amadurecimento, da variabilidade genética e das condições climáticas quando os frutos são colhidos (MALHEIRO, 2007). A composição química pode afetar as propriedades reológicas do fruto, levando a alterações estruturais importantes (THOMPSON; SUPAPVANICH; SIRISON, 2019). Durante o amadurecimento, uma série de alterações é gerada na parede celular (formada por hemiceluloses, celulosas, pectinas e algumas proteínas) e nos polissacarídeos da lamela média da parede celular causada pela atividade enzimática (ANDREUCETTI, 2005; THOMPSON; SUPAPVANICH; SIRISON, 2019; DAS *et al.*,

2023). O movimento da água da casca para a polpa durante a maturação da banana também gera mudanças na textura do fruto, facilitando a separação da casca da polpa (THOMPSON; SUPAPVANICH; SIRISON, 2019; DAS *et al.*, 2023; YANG *et al.*, 2022). A textura do tomate é influenciada pela espessura da epiderme, pela firmeza da polpa e pela relação estrutural entre o pericarpo e o material placentário (CASTRO, 2003; RESENDE *et al.*, 2004).

Além disso, é necessário considerar que as frutas são submetidas a diferentes cargas ou forças como resultado de atividades pós-colheita, como manuseio, transporte e embalagem. Essas forças podem causar danos mecânicos à fruta e afetar sua qualidade e valor comercial. Esse dano mecânico ou fratura do fruto gerado por uma força externa pode levar à alteração química da cor, afetar o sabor e até mesmo romper a superfície do produto (RESENDE *et al.*, 2004). No caso do tomate, a textura se soma à cor como um dos atributos mecânicos mais relevantes na demanda de qualidade do fruto para comerciantes e consumidores, o que determina a aceitabilidade do fruto fresco. Assim, a medição e o estudo do processo da perda de textura são necessários no controle da qualidade dos frutos na etapa de pós-colheita, no manuseio e no processamento dos frutos (RESENDE *et al.*, 2004). Os testes de firmeza da fruta podem ser realizados medindo-se a resistência à penetração, a compressão, a deformação, o achatamento, o teste de pressão de turgescência, entre outros (CASTRO, 2003). Neste estudo foi empregado o teste mecânico por punção com agulha de Magness-Taylor, que consiste no uso de uma sonda cilíndrica de diâmetro variável para medir a resistência do pericarpo do fruto à penetração (CHIUMARELLI, 2011).

2.8.4. ACIDEZ E pH

À medida que as frutas amadurecem, especialmente as Musaceae, elas sintetizam ácidos orgânicos como ascórbico, málico, oxálico, tartárico, fumárico, málico e cítrico, sendo os ácidos cítrico e málico os mais abundantes em bananas (YAO HOU *et al.*, 2022; ANDREUCETTI, 2005; THOMPSON; SUPAPVANICH; SIRISON, 2019). A concentração total de ácidos orgânicos nas frutas aumenta à medida que elas amadurecem, levando a uma diminuição do potencial de hidrogênio (pH). O pH é um indicador da qualidade organoléptica da fruta, incluindo aroma e sabor. O pH do tomate é determinado pelo teor de ácidos orgânicos, sendo o ácido cítrico o mais abundante. Os tomates maduros têm um pH entre

4,0 e 4,8 (CASTRO, 2003). Por outro lado, nas bananas, dependendo da cultivar, ocorre uma redução acelerada do pH da polpa à medida que a fruta amadurece. Portanto, à medida que os valores de acidez aumentam, o pH dos frutos amadurecidos diminui, mas quando os frutos chegam a uma sobre maturação, o pH tende a aumentar novamente (MEJIA, 2013).

A acidez em frutos pode ser determinada por análises química de titulação, um método amplamente utilizado na indústria alimentícia (NIELSEN, 2017). No ensaio de acidez titulável é usada uma solução alcalina padrão (hidróxido de sódio) com concentração previamente determinada que reage com os ácidos orgânicos presentes nas amostras da fruta misturadas com um indicador (fenolftaleína). A reação apresenta como ponto final de titulação a mudança de cor de transparente a rosa quando a solução chega a um pH de 8,2. No entanto, como a determinação do ponto final da reação pode ser difícil ao analisar uma amostra colorida, é necessário monitorar o pH da solução até que o ponto esperado seja alcançado. O volume usado para neutralizar os ácidos e a normalidade da solução padrão junto com o volume da amostra são utilizados no cálculo da acidez titulável expressa em termos do ácido predominantes na amostra da fruta (geralmente ácido cítrico) (NIELSEN, 2017).

2.8.5. SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS

O teor de sólidos solúveis totais (SST) e principalmente de açúcares como glicose e frutose (formados por hidrólise de amido) aumenta durante o processo de amadurecimento de bananas e tomates (MEJIA, 2013; ANDREUCCETTI, 2005). O teor de SST aumenta até atingir um pico e, em seguida, a sobre maturação tende a diminuir devido à conversão do açúcar da polpa em álcool, em decorrência do início dos processos de fermentação (MEJIA, 2013). A determinação do SST é necessária porque a quantidade de sólidos, especialmente ácidos orgânicos e açúcares, estão relacionados ao sabor da fruta (2008). A relação dos SST e a acidez representam um índice útil do grau de maturidade da fruta (PERALTA-RUIZ *et al.*, 2020).

3. PRESSUPOSTOS E PROBLEMA DE ESTUDO

O Estudo 1 foi idealizado com base nos seguintes pressupostos teóricos:

- Uma alta gama de fungos devasta os frutos da banana durante a fase pós-colheita, o que leva a perdas econômicas no setor agroalimentar;
- *Thielaviopsis ethacetica* é um patógeno que causa doenças em culturas industriais e alimentícias, como a banana;
- As tecnologias atuais para o controle de agentes de deterioração de frutas são escassas e não respondem às demandas dos mercados internacionais que exigem estratégias ecologicamente corretas e livres de pesticidas;
- O estudo prospectivo do potencial antifúngico de óleos essenciais extraídos da flora local é uma estratégia promissora na busca de alternativas;
- Espécies vegetais do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba têm sido objeto de inúmeros estudos biológicos, mas o potencial antifúngico ainda é pouco explorado, com um estudo recente contra *Thielaviopsis ethacetica* a partir de extratos orgânicos polares das plantas de Restinga, *Annona acutiflora* e *Sideroxylon obtusifolium*;
- O potencial dos óleos essenciais de espécies presentes no ecossistema da Restinga de Jurubatiba ainda é desconhecido;
- Os principais compostos dos óleos essenciais, como o cinamaldeído, foram descritos com atividade microbiana contra bactérias e outros fungos fitopatogênicos;
- A emulsificação se mostra uma tecnologia promissora para a veiculação de derivados potenciais e sua aplicação em frutas;
- O efeito do óleo essencial de uma planta nativa brasileira e do cinamaldeído na forma nanoemulsionada sobre os parâmetros físico-químicos da banana armazenada é desconhecido;

Portanto, a hipótese do Estudo 1 é que a emulsificação de óleos essenciais de plantas da Restinga ou sua combinação com o composto cinamaldeído será viável para o controle *in vitro* de *Thielaviopsis ethacetica* e a melhoria do tempo de prateleira da banana.

O Estudo 2 foi desenvolvido com base nas seguintes premissas teóricas:

- O fruto do tomate é altamente perecível e é continuamente afetado por patógenos em sua cadeia produtiva, com grande prejuízo na fase pós-colheita;
- *Alternaria alternata* é um fungo que causa a doença agrícola mancha de *Alternaria* no tomate e outros frutos de alta importância econômica para o Brasil (AGROFIT, 2023);
- A preocupação com o difícil controle da *Alternaria alternata* é grande, considerando que algumas cepas desse patógeno são perigosas produtoras de micotoxinas, diante da falta de monitoramento governamental desses contaminantes em frutas e subprodutos, apesar dos alertas das autoridades sanitárias europeias;
- Foi relatado que os óleos essenciais de plantas aromáticas, como o capim-limão (*Cymbopogon citratus*), têm propriedades antifúngicas;
- Estudos que utilizam tecnologias de microencapsulação de óleos essenciais demonstraram ser viáveis para evitar a degradação dos óleos essenciais, potencializar sua atividade biológica e facilitar sua aplicação em matrizes alimentícias;
- Os revestimentos aplicados a frutas parecem melhorar as propriedades físico-químicas, retardar o amadurecimento e evitar a degradação por patógenos;
- O uso de biopolímeros na formulação de biotecnologias como micropartículas tornou-se uma tecnologia ambientalmente aceitável para o setor de alimentos;
- O potencial de revestimentos contendo micropartículas de óleo essencial de *C. citratus* sobre a vida útil de tomates revestidos e seu efeito curativo quando contaminados com esporos de *A. alternata* ainda é desconhecido.

Assim, a hipótese do Estudo 2 é que a microencapsulação do óleo essencial de *C. citratus* aumentará sua atividade contra o fungo *A. alternata* em condições *in vitro* e *in situ* usando revestimentos comestíveis como matrizes transportadoras em tomate como uma biotecnologia capaz de melhorar a vida útil do fruto durante o armazenamento.

4. JUSTIFICATIVA

Atualmente, há falta de estratégias sustentáveis para o controle de fungos patogênicos que afetam negativamente a produção agroalimentar, mesmo no contexto de grandes produtores agrícolas como o Brasil. As doenças agrícolas geram um grande ônus para o sistema de produção global devido aos altos volumes de frutas que são desperdiçados por causa delas, além de ameaçar a segurança alimentar (SINGH *et al.*, 2023; FISHER *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2020). No entanto, as cadeias de produção agrícola continuam a depender do uso de pesticidas sintéticos para controlar os agentes etiológicos de pragas e doenças (ADHIKARI; OH; PANTHEE, 2017; FAGUNDES *et al.*, 2013), apesar dos alertas das instituições de saúde pública e da comunidade científica internacional e nacional (CARNEIRO *et al.*, 2015; FENG *et al.*, 2023; TILOCCA; CAO; MIGHELI, 2020; INCA, 2023). A situação piorou quando as restrições ambientais causadas por produtos químicos e a pressão dos consumidores forçaram o setor agroalimentar a adotar a produção de frutas sem pesticidas.

Assim, o estudo e o desenvolvimento de bioprodutos para o controle fitossanitário a partir de derivados vegetais, microbianos e minerais têm despontado como uma alternativa para o problema (MIASKOWSKA *et al.*, 2020; TILOCCA; CAO; MIGHELI, 2020). De tal modo, o presente estudo teve como premissa avaliar o efeito de derivados de plantas do Estado do Rio de Janeiro, utilizando técnicas biotecnológicas, sobre dois fungos fitopatogênicos que incidem sobre dois alimentos de impacto mundial, a banana e o tomate. A linha de pesquisa deste trabalho se enquadra no Objetivo 2 da Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável, aprovada em 25 de setembro de 2015 pela Organização das Nações Unidas, que consiste em acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar, melhorar a nutrição e promover a agricultura sustentável (IPEA, 2019).

A tentativa de abordar o problema das tecnologias limpas para o controle de vetores de degradação de frutas por meio da prospecção da atividade antifúngica da riqueza vegetal é uma estratégia interessante e ecologicamente aceitável (DAMALAS; KOUTROUBAS, 2020). Territórios megadiversos como o Brasil têm as vantagens e as possibilidades de estudar novas moléculas para o desenvolvimento de biopesticidas enquadrados nas recentes políticas de bioeconomia às quais o país aderiu (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018). A

identificação do potencial antifúngico de uma planta nativa presente no território abre possibilidades de conservação, pois essas descobertas permitirão que os serviços ecossistêmicos e as novas aplicações bioeconômicas resultantes despertem o interesse em conservar a espécie e estabilizar seu status populacional nos ecossistemas cada vez mais ameaçados (DUARTE *et al.*, 2022). Claramente, a extração de material bioativo promissor que deve ser realizada por meio de cultivo permitirá a geração de empregos para o setor agrícola dedicado à obtenção de derivados de plantas como insumos para futuros biopesticidas.

Esse projeto busca encontrar medidas alternativas para controlar patógenos que foram catalogados como de difícil controle devido à sua ampla variedade de hospedeiros e à longa fase vegetativa dormente nas culturas, como *Thielaviopsis ethacetica* (BORGES *et al.*, 2019) e *Alternaria alternata* (SHARMA *et al.*, 2021). Embora seja certo que as doenças nas frutas priorizadas neste estudo, como a banana e o tomate, sejam causadas por complexos fúngicos, o fato de abordar esse problema avaliando um dos fitopatógenos do complexo abre a porta para que outros grupos de pesquisa se orientem ou melhorem o esquema experimental apresentado com os outros fungos fitopatogênicos.

Do ponto de vista metodológico, essa proposta experimental é bastante relevante porque combina uma série de técnicas biotecnológicas e métodos de análise microbiológica usados para tratar as abordagens complexas e diversas que giram em torno do estudo fungicida de derivados de plantas. A emulsificação por diferentes métodos permite superar as limitações inerentes aos óleos essenciais para sua aplicação na indústria agroalimentar (PASCUAL-VILLALOBOS *et al.*, 2019). Também é fundamental ressaltar a importância de explorar métodos alternativos que promovam a sustentabilidade, especialmente no setor agroalimentar. A microencapsulação de derivados vegetais promissores e sua incorporação em revestimentos biodegradáveis representam uma solução promissora que pode ter um impacto significativo na melhoria da preservação de frutos pós-colheita e na redução do seu desperdício (PERALTA-RUIZ *et al.*, 2020). O uso desses revestimentos não é apenas uma abordagem prática, mas também ecologicamente correta, o que está de acordo com a crescente demanda por práticas sustentáveis. Portanto, é altamente recomendável o desenvolvimento de pesquisas sobre a aplicação de revestimentos biodegradáveis e seus

possíveis benefícios ao setor agroalimentar (GLICERINA *et al.*, 2022; GRANDE TOVAR *et al.*, 2019; PERALTA-RUIZ *et al.*, 2020).

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

O presente projeto visou avaliar o potencial biotecnológico de óleos essenciais procedentes do Estado do Rio de Janeiro para o controle de fungos fitopatógenos de interesse agroalimentar.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Considerando que o presente projeto teve como foco a busca de bioprodutos para o controle de dois fungos fitopatogênicos, optou-se por dividir o projeto em dois estudos. O primeiro foi focado na triagem antifúngica de óleos essenciais de plantas endêmicas do ecossistema de restinga (Rio de Janeiro) em combinação com um derivado volátil sintético sob a forma de emulsificação contra um patógeno causador da podridão de bananas e seus efeitos nos frutos durante o armazenamento (*Estudo 1*). Enquanto isso, o segundo estudo procurou avaliar o efeito da microencapsulação e da formulação de revestimentos comestíveis à base do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre o desenvolvimento patogênico do fungo *Alternaria alternata* em tomates como um patossistema (*Estudo 2*). Por isso, definiu-se um objetivo específico para cada estudo, que contém os subobjetivos necessários para atingir tal objetivo específico.

- a. O *Estudo 1* tem por objetivo verificar o efeito de derivados vegetais voláteis naturais e sintéticos emulsificados sobre *Thielaviopsis ethacetica*, fungo fitopatógeno da banana, durante o armazenamento da fruta. Neste objetivo específico pertencem os seguintes subobjetivos.
 - (i) Obter óleos essenciais das plantas de estudo pertencentes ao Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba por meio da técnica de hidrodestilação;
 - (ii) Determinar a composição química dos óleos essenciais por meio de técnicas cromatográficas;
 - (iii) Fazer uma varredura quantitativa da atividade antifúngica *in vitro* de óleos essenciais sobre o fungo *Thielaviopsis ethacetica*.

- (iv) Formular nanoemulsões pelo baixo aporte energético a partir de óleos essenciais de Restinga para caracterizá-las por análises de espalhamento de luz e avaliar seu potencial por microdiluição com abordagem quantitativa.
- (v) Desenvolver e caracterizar emulsões pelo alto aporte energético do óleo essencial de *A. acutiflora* e cinamaldeído para avaliar seu efeito sobre bananas;
- (vi) Comparar o potencial antifúngico do óleo essencial e o composto volátil pré-selecionados e suas nanoformulações por meio de testes de susceptibilidade a antimicrobianos.
- (vii) Comparar a ação das emulsões bioativas sobre a microbiota das bananas inoculadas com esporos de *T. ethacetica*
- (viii) Avaliar o efeito de emulsões com potencial fungistático sob parâmetros físico-químicos da banana durante sua estocagem;

b. O *Estudo 2* visou avaliar o efeito de revestimentos especialmente formulados a partir de fécula de mandioca e óleo essencial de *Cymbopogon citratus* na forma coacervada e livre sobre o fitopatógeno *Alternaria alternata* em tomates armazenados. Os subobjetivos deste objetivo específico são descritos a seguir.

- (ix) Caracterizar a composição química do óleo essencial de *C. citratus* por cromatografia gasosa CG-MS/CID.
- (x) Realizar uma triagem experimental de biopolímeros e condições ideais para a microencapsulação do óleo essencial de *C. citratus* por coacervação complexa.
- (xi) Produzir micropartículas encapsulando o óleo essencial de *C. citratus* e determinar o rendimento de complexação polimérica e coacervação complexa do sistema alginato-gelatina tipo B.
- (xii) Caracterizar a morfologia por microscopia ótica e o tamanho médio e a distribuição das micropartículas por análise de fragmentação por luz laser, bem como a comprovação da encapsulação do óleo;
- (xiii) Identificar a atividade fungistática e fungicida do óleo essencial de *C. citratus* na forma livre e microencapsulado contra o fungo *Alternaria alternata* pelo método de microdiluição;

- (xiv) Formular e caracterizar propriedades físico-químicas de revestimentos comestíveis a base de fécula de mandioca incorporando o óleo essencial promissor livre e coacervados contendo o derivado vegetal;
- (xv) Verificar o progresso da doença causada por *Alternaria alternata* em tomates revestidos com emulsões formadoras de filme contendo o óleo promissor livre e o encapsulado em micropartículas coacervadas;
- (xvi) Monitorar os parâmetros físico-químicos de tomates em armazenamento com temperatura controlada que foram revestidos com soluções formadoras de filme à base de fécula de mandioca contendo o óleo promissor livre e o encapsulado em micropartículas coacervadas.

6. MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental deste trabalho teve o apoio técnico e científico dos seguintes laboratórios e instituições: Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais (LTPN), o Laboratório de Tecnologia Microbiana (LTM) e a Central Analítica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense (UFF); Laboratório em Inovação de Alimentos (LINA), o Laboratório de Microbiologia de Alimentos I (LMA-I) e o Laboratório de Engenharia de Processos (LEP) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Considerando que o presente projeto foi desenhado com dois grandes objetivos específicos, dois diferentes blocos experimentais contendo testes semelhantes ou não foram elaborados para dar cumprimento a cada objetivo específico.

6.1. METODOLOGIA DO ESTUDO 1

A Figura 15 ilustra o esquema experimental do *Estudo 1*, indicando os diferentes subobjetivos por etapas e seus respectivos processos/atividades.

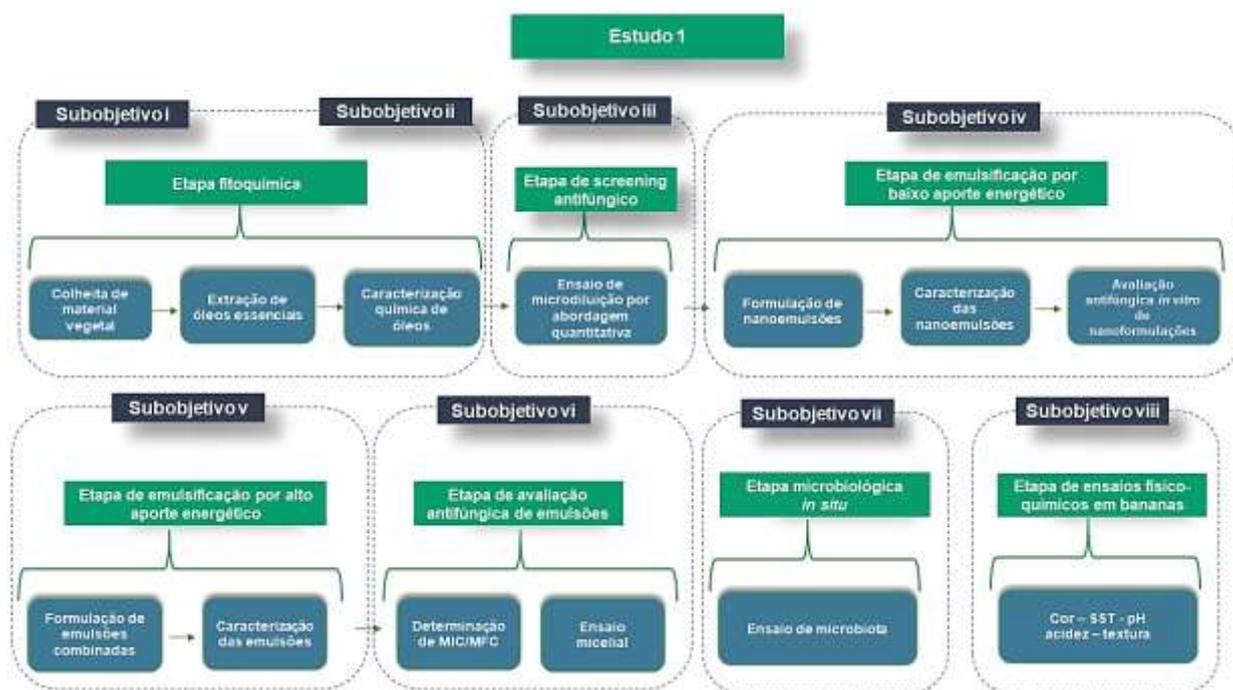


Figura 15 – Esquema experimental do Estudo 1.

6.1.1. ETAPA FITOQUÍMICA

6.1.1.1. Material vegetal

Folhas das espécies vegetais *Annona acutiflora* e *Xylopia ochrantha* foram coletadas no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), localizado no município de Carapebus, no norte do Estado de Rio de Janeiro. A colheita com fins acadêmicos foi realizada de acordo com a autorização n° 13659-2 emitida pelo sistema SISBIO de Autorização de Pesquisa nas Unidades de Conservação Federal do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), autoridade adstrita ao Ministério do Meio Ambiente do Brasil. Exsicatas das plantas coletada foram depositados no Herbário da Faculdade de Formação de Professores da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). O uso de material vegetal desse projeto foi registrado sob o código A491A56 no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

6.1.1.2. Obtenção de óleos essenciais

Inicialmente, foram testados óleos essenciais das plantas *Annona acutiflora*, *Myrcia amazonica*, *Myrciaria floribunda*, *Xylopia ochrantha*, *Ocotea pulchella*, e *Pilocarpus spicatus*, que foram cedidos do estoque de material vegetal do Laboratório de Tecnologia de produtos Naturais (LTPN/FF/UFF). Estes óleos foram obtidos de material vegetal procedentes do PNRJ em anos anteriores ao presente estudo. Após realizar uma varredura antifúngica com três fungos filamentosos (incluindo *Thielaviopsis ethacetica*), optou-se por trabalhar com material vegetal das plantas *Annona acutiflora* e *Xylopia ochrantha*. As folhas das plantas de *Annona acutiflora* (22° 14' 33.836" S – 41° 35' 36.689" O) e *Xylopia ochrantha* (22° 13' 0840" S – 41° 35' 1630" O) foram coletadas em março de 2023 no PNRJ, sendo transportadas em sacolas para o Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais (LTPN/FF/UFF). As folhas foram fragmentadas separadamente em liquidificador industrial com água destilada. Posteriormente, este material vegetal foi colocado no balão sob aquecimento para ser submetido ao processo de hidrodestilação em aparato modificado tipo Clevenger durante 4 h (TIETBOHL *et al.*, 2014). O óleo resultante foi seco com sulfato de sódio anidro - Na₂SO₄,

filtrado e acondicionados. Todos os óleos essenciais recuperados foram conservados em recipiente âmbar no freezer (-20 °C).

6.1.1.3. Caracterização química dos óleos essenciais

A composição química dos óleos essenciais foi identificada por meio do cromatógrafo a gás GCMS-QP5000 (Shimadzu), acoplado com espectrômetro de massas por ionização de elétrons nas condições de cromatografia gasosa relatadas por Folly *et al.* (2021). A cromatografia gasosa foi realizada sob as seguintes condições: o injetor operou a 260 °C; o gás de arraste utilizado foi o hélio com uma vazão de 1 mL min⁻¹ e injeção realizada com proporção de divisão 1:40. A temperatura do forno passou de 60 °C a 290 °C com uma taxa de 3 °C min⁻¹. As amostras dissolvidas em n-hexano grau CG na concentração de 1000 ppm foram injetadas em uma coluna RTX-5 (0,25 mm DI, 30 m de comprimento e 0,25 µm de espessura de filme). A identificação das substâncias foi realizada comparando os índices de retenção (IR) e espectros de massa obtidos com os relatados na literatura (ADAMS, 2007), assim como também o padrão de fragmentação de MS dos compostos foi comparado com as bibliotecas de espectros de massa NIST. Posteriormente, a análise quantitativa dos constituintes químicos dos óleos essenciais foi realizada em um cromatógrafo gasoso CG-2014 (Shimadzu) acoplado com um detector de ionização de chama (CG-DIC), nas mesmas condições da análise por CG/EM usando o detector de ionização de 290 °C. O método de normalização da área do pico do FID foi utilizado para determinar as porcentagens dos compostos (FOLLY *et al.*, 2021).

6.1.2. ETAPA DE VARREDURA ANTIFUNGICA

6.1.2.1. Obtenção do estoque da cultura pura

O fungo filamentoso *Thielaviopsis ethacetica* Went, (E-748) foi fornecido gentilmente pela Coleção de Fungos Filamentosos do Laboratório Fitopatológico Incaper do Estado de Espírito Santo sob a direção do Prof. Dr. José Ventura Aires. Um microcultivo deste microrganismo foi feito com a finalidade de conferir as informações de estrutura microscópica e macroscópica dos fungos, previamente relatados na literatura científica.

Seguidamente, o fungo foi estocado na forma de conídios congelados, para facilitar seu uso nos testes de avaliação antifúngica. Para isso, meio nutritivo Batata Dextrose Agar - BDA (Acumedia Laboratories, Michigan, USA) solidificado em garrafas de cultura de 25 cm² estéreis foi inoculado com conídios do fungo *T. ethacetica* utilizando alças estéreis e incubado em estufa a 25 °C por 14 d. Após o período de incubação, foram adicionados 20 mL de glicerol 20% (v/v) estéril em cada garrafa e, com o auxílio de alças estéreis, os conídios foram suspensos. A suspensão obtida foi filtrada com três camadas de gaze estéril e os conídios foram quantificados utilizando a câmara de Neubauer ao microscópico ótico (objetiva de 40x). Finalmente, a suspensão de conídios (já contendo glicerol 20% estéril) foi congelada em tubos tipo Eppendorf de 1 mL.

6.1.2.2. Varredura antifúngica preliminar

A suscetibilidade do fitopatógeno *T. ethacetica* aos óleos essenciais extraídos de plantas nativas do Parque Nacional de Restinga de Jurubatiba (PNRJ) foi testada através do método de microdiluição com diferentes abordagens de avaliação. Ensaio antifúngicos contra o fungo *Thielaviopsis ethacetica* foram realizados empregando óleos essenciais cedidos do Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais (LTPN/FF/UFF) das plantas *Annona acutiflora*, *Myrcia amazonica*, *Myrciaria floribunda*, *Xylopiya ochrantha*, *Ocotea pulchella*, e *Pilocarpus spicatus* e um óleo de *Cymbopogon citratus* (capim-limão). Estes óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação conforme relatado no presente estudo. Adicionalmente, como parte do screening de atividade fungistática, os óleos do estoque foram testados contra os fungos *Fusarium guttiforme*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* (Ver Apêndice B, dados não discutidos no presente trabalho). O ensaio consistiu na avaliação do crescimento de conídios fúngicos em microplacas de 96 poços contendo caldo Sabouraud dextrose (SDB) misturado com óleos de *A. acutiflora* e *X. ochrantha* em três diferentes concentrações. As soluções de estoque dos óleos essenciais foram misturadas em uma solução aquosa adicionando previamente 0,5% (v/v) de DMSO sob agitação por 2 min no misturador vórtex. Os óleos essenciais foram testados em concentrações de 5000, 2500 µg mL⁻¹. O solvente Tween 80 (0,5% v/v) e o itraconazol (20 µg mL⁻¹) foram considerados os controles negativo e positivo para o desenvolvimento do ensaio, respectivamente.

Micropoços contendo apenas meio nutritivo estéril serviram como controle de crescimento fúngico. Cada poço foi inoculado com 5 µL da suspensão conidial em uma concentração de 1×10^6 conídios mL⁻¹. Um controle de esterilidade foi feito usando poços contendo apenas o meio nutritivo sem inoculação. As placas foram incubadas a 25 °C por 72 h em um shaker sem agitação com fotoperíodo de 12 h.

Inicialmente, após incubação das placas foi usada uma abordagem de avaliação qualitativa aplicando o corante resazurina 0,01% (m/v) nos micropoços. A resazurina é um indicador redox que permite detectar a viabilidade celular por meio da mudança de cor roxo a rosa (MONTEIRO *et al.*, 2012). Os derivados vegetais com atividade fungistática destacada nessa etapa foram testados por microdiluição com uma abordagem quantitativa baseada em medições de absorvância das soluções nas placas (Souza *et al.*, 2020). Para isso, novas placas foram preparadas conforme mencionado acima e ao final de 72 h de incubação, a absorvância a 630 nm (A_{630}) das placas foi medida com um leitor automático de placas (Thermo Plate Reader). A taxa de inibição de crescimento foi calculada como a porcentagem de inibição fúngica após 90 h de incubação, usando Eq 1.

$$\text{Inibição fúngica (\%)} = 100 - \frac{100 \times (A_{630} \text{ do tratamento} - \text{média } A_{630} \text{ da absorção background})}{(A_{630} \text{ de poço de crescimento} - \text{Average } A_{630} \text{ do meio nutritivo})} \quad (\text{Eq. 1})$$

6.1.3. ETAPA DE NANOEMULSIFICAÇÃO PELO MÉTODO DE BAIXO APORTE DE ENERGIA

6.2.3.1. Formulação da nanoemulsificação

A nanoemulsificação foi desenvolvida baseado em alguns aspectos do método de baixo aporte energético proposto por Ostertag, Weiss e McClements (2012). Formulações com a seguinte composição foram preparadas: 5% (m/m) dos surfactantes Tween 20 (Polisorbato 20) e Span 80 (monooleato de sorbitano) na proporção 4:1, 5% (m/m) de cada óleo essencial e 90% (p/p) de água milli-Q estéril. Na preparação das nanoemulsões a fase oleosa, constituída por óleo e surfactantes, é homogeneizada por agitação magnética (400 rpm) por 30 min à temperatura ambiente e a fase aquosa (água milli-Q estéril) é adicionada à fase oleosa sob a mesma agitação magnética contínua (400 rpm) durante 1 h.

6.1.3.2. Caracterização das nanoemulsões

As nanoemulsões foram caracterizadas por meio da análise do tamanho das gotículas (nm) e índice de polidispersividade (IPD) pela técnica do Espalhamento Dinâmico da Luz (EDL) em Zetasizer Ultra-Pro (Malvern, UK). As amostras foram diluídas em água milli-Q (1:25), e as medições foram realizadas em triplicata, na temperatura de 25 °C.

6.1.3.3. Avaliação antifúngica in vitro de nanoformulações

O potencial antifúngico das nanoemulsões dos óleos essenciais das plantas *Annona acutiflora*, *Xylopiya ochrantha* e *Cymbopogon citratus* foram testadas também por microdiluição contra o fungo *T. ethacetica* conforme descrito na subseção 6.1.2.2.

6.1.4. ETAPA DE EMULSIFICAÇÃO POR TECNICA DE ALTO APORTE ENERGETICO

6.1.4.1. Emulsificação combinada

A partir dos testes preliminares, decidiu-se verificar se a mistura de óleo essencial de *A. acutiflora* e cinamaldeído (C₉H₈O - Quinari), um aldeído amplamente estudado com potencial microbiano, poderia aumentar o efeito sobre o fungo *T. ethacetica* e as propriedades físico-químicas da banana. Para esse fim, foram produzidas uma emulsão primária de cinamaldeído (Cin) e óleo essencial de *A. acutiflora* (E-AaCin) na proporção de 1:1 e uma emulsão somente de cinamaldeído (E-cin). A emulsão primária mista foi preparada misturando-se 0,25% (m/v) do OE de *A. acutiflora* e 0,25% (m/v) de cinamaldeído com 0,75% (v/v) de Tween 80 e homogeneizada em um agitador magnético (C-MAG HS 7 IKA - Velocidade 2) por 10 min. Em seguida, 98,25 mL de água milli-Q estéril foram adicionados à fase oleosa para serem agitados em um homogeneizador T19 Ultra-Turrax a uma velocidade de 15.000 rpm por 5 min. A emulsão de cinamaldeído foi preparada sob as mesmas condições, adicionando-se 0,5% de cinamaldeído à fase oleosa. Uma emulsão primária foi preparada adicionando-se apenas surfactante e a fase aquosa sob as mesmas condições (emulsão branca ou controle negativo).

6.1.4.2. Caracterização físico-química das emulsões

As emulsões foram caracterizadas usando a técnica de espalhamento dinâmico da luz (Dynamic Light Scattering - DLS) em um Zetasizer Nano ZS (Malvern, Reino Unido) no Laboratório de Engenharia de Processos (LEP) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Foram avaliados os parâmetros de tamanho de gota (expresso em nm), índice de polidispersividade (IPD) e potencial zeta - Potencial ζ (expresso em mV). As amostras foram diluídas em água milli-Q (1:100), e as medições foram realizadas em triplicata, a 25 °C.

6.1.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA DE EMULSÕES

6.1.5.1. Preparo do inóculo

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) das nanoemulsões combinadas produzidas foram verificadas contra *T. ethacetica* de acordo com o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI). As suspensões fúngicas de *T. ethacetica* preparadas anteriormente (vide seção 6.1.2.1.) foram reativadas em placas de Petri contendo o meio ágar extrato de malte (MEA) solidificado. A partir dessas placas incubadas a 25 °C por 7 d, foi preparada uma suspensão de esporos usando Tween 80 a 2% (v/v). A suspensão de inóculo foi padronizada para 1×10^6 conídios mL⁻¹ por contagem em câmara de Neubauer com auxílio do microscópio ótico.

6.1.5.2. Teste de microdiluição padronizado

O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 poços usando o meio nutritivo RPMI 1640 de acordo com o método padronizado pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). As emulsões ou o óleo essencial puro ou o cinamaldeído foram aplicados nas primeiras colunas da placa para serem diluídos em série com auxílio de um pipetador multicanal de forma a obter concentrações de 2000, 1000, 500, 250, 250, 125, 62,5, 31,25, e 15,63 ppm (v/v). Foram feitos o controle negativo (nanoemulsão branca, isto é, sem adição de ativos) e controle de crescimento (adição do microrganismo em meio sem

adição de nanoemulsão ou óleo/fitocomposto). As placas foram seladas com filme plástico e incubadas a 25 °C, e o crescimento foi observado após 5 d.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração de emulsão ou óleo na qual não foi observado crescimento fúngico. A inibição visual do crescimento foi possível pela mudança de cor do meio RPMI 1640 de rosa (inicialmente) para amarelo devido à alteração do pH no meio causada pelo crescimento fúngico. Posteriormente, com a finalidade de determinar a concentração fungicida mínima (CFM) dos bioprodutos, foi realizado um plaqueamento do conteúdo total das placas para meio nutritivo solidificado em placas de Petri. Para isso, 20 µL do conteúdo de cada micropoço com atividade inibitória foram colocados em placas de Petri contendo BDA solidificado com uma distribuição aleatória. Essas placas foram incubadas a 25 °C por 48 h e avaliadas quanto ao crescimento de fungos na superfície do meio.

6.1.5.3. Teste micelial

As emulsões e os derivados vegetais puros foram dissolvidos na concentração de 2 mg mL⁻¹. Um volume de 100 µL destas soluções oleosas foram vertidas nas superfícies de placas de Petri contendo meio PDA esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min, sendo posteriormente homogeneizadas com o auxílio de alça de Drigalski estéril. Seguidamente, discos de 6 mm de cultura fúngica de *T. ethacetica* com 14 d de crescimento foram colocados no centro da placa, usando uma pinça estéril. O experimento teve o controle negativo empregando a emulsão branca (surfactantes sem óleo) e o controle em branco (placa micelial sem tratamento). Após 24, 48 e 72 h, o crescimento micelial foi avaliado medindo-se o diâmetro (mm) das colônias em duas direções perpendiculares, com auxílio de régua milimetrada (RODRIGUES *et al.*, 2020). O teste foi realizado em triplicata.

6.1.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DAS EMULSÕES SOBRE A ESTOCAGEM DE BANANAS

6.1.6.1. Acondicionamento das bananas

Coroas de banana da variedade ouro foram adquiridas na Central de Abastecimento da cidade de Campinas, SP (CEASA) e transportadas para o Laboratório de Inovação em

Alimentos (LINA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os frutos foram lavados com detergente e água destilada, imersos em uma solução de hipoclorito de sódio a 1% por 5 min e lavados novamente com água destilada por 2 vezes. Em seguida, os frutos foram secos em temperatura ambiente por 2 h. Posteriormente, foram armazenados a 5 °C por no máximo 2 d para ser usados durante os experimentos. Um lote de bananas (n = 40 unidades) foi analisado pelo ensaio microbiológico *in situ* após um período de incubação enquanto outro lote de bananas (n = 96 unidades) foi analisado a cada 5 d de armazenamento sob os parâmetros físico-químicos de cor, pH, sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável e textura.

6.1.6.2. Ensaio de microbiota

O experimento foi conduzido de acordo com Rocha *et al.* (2016) com algumas modificações. As bananas foram condicionadas e desinfetadas em UV por 15 min e imersas por 60 s em tratamentos de emulsão à base de *A. acutiflora* e cinamaldeído (Quadro 3; vide seção 6.1.4.1.). A suspensão de conídios fúngicos de *Thielaviopsis ethacetica* foi ajustada para 5×10^5 esporos mL⁻¹ e inoculada no pêndulo de banana exposto após a separação da ráquis. Em seguida, os frutos foram colocados em recipientes fechados e incubados em uma estufa BOD a 25 °C por 12 d, com umidade relativa variando de 97,5 a 99,0% (obtida usando uma solução de K₂SO₄ a 30%), conforme descrito por Winston e Bates (1960). Os registros de temperatura e umidade relativa foram monitorados com um termohigrômetro pré-calibrado. Cada grupo tratado foi composto de 10 unidades de banana distribuídas aleatoriamente. Após o período de armazenamento, 25 g de polpa de cada banana tratada trituradas foram adicionadas a 225 mL de água peptonada estéril a 0,1% para formar a diluição inicial (10⁻¹), após o que as amostras foram homogeneizadas. A partir da diluição inicial, foram preparadas diluições seriadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada a 0,1% até uma diluição de 10⁻⁴. Em seguida, 0,1 mL de cada diluição foi plaqueado pela técnica em superfície em meio de cultura Ágar Extrato de Malte (MEA) solidificado e suplementado com ácido tartárico e incubado em uma estufa BOD a 25 °C por 5 d (PITT; HOCKING, 2009). Os testes foram realizados para avaliar o desenvolvimento microbiológico sob tratamento emulsionado.

Quadro 3 - Grupos experimentais dos ensaios de revestimento em frutos

Grupo	Tratamento	Número de frutos por experimento	
		Teste antifúngico <i>in situ</i>	Teste <i>de prateleira</i>
Grupo 1	Bananas tratadas com a emulsão combinada OE de <i>A. acutiflora</i> e cinamaldeído (E-AaCin)	10	24
Grupo 2	Bananas tratadas com a emulsão de cinamaldeído (E-Cin)	10	24
Grupo 3	Bananas tratadas com o branco das emulsões	10	24
Grupo 4	Bananas tratadas com água estéril	10	24

6.1.6.3. Ensaio de vida de prateleira

6.1.6.3.1. Aplicação dos tratamentos emulsificados nas bananas

As diferentes bananas de cada cacho foram codificadas e, quando desprendidas, foram distribuídas aleatoriamente em cada um dos grupos experimentais. O experimento foi projetado com quatro grupos contendo 24 frutos cada. As bananas foram completamente imersas individualmente nos tratamentos indicados no Quadro 3 por 1 min. Após 1 h em temperatura ambiente (26 °C), as bananas secas foram colocadas em recipientes plásticos fechados e separados por cada grupo e armazenadas por 12 d a 25 °C em uma incubadora BOD no Laboratório de Refrigeração (FEA-UNICAMP). Medições de cor, pH, SST, textura e acidez titulável foram realizadas em bananas independentes durante os dias 0, 5 e 10 de armazenamento.

6.1.6.3.2. Determinação da cor instrumental

A mudança na cor das bananas foi monitorada quantitativamente por colorimetria usando um calorímetro calibrado (CM-2600D, iluminante D65 Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japão) de acordo com o sistema CIELAB para determinar o L* (luminosidade – intervalo de preto para branco), a* (coordenada relativa de verde para vermelho) e b* coordenada relativa de amarelo para azul. As medições foram feitas para cada uma das

amostras independentes em cada grupo, realizando 3 determinações em áreas aleatórias (lado próximo ao ápice, centro, lado próximo ao pêndulo) da casca de 3 bananas de cada grupo em cada momento da avaliação (dia 0, dia 5 e dia 10 de armazenamento). A partir dos parâmetros L^* , a^* e b^* , foram determinados a razão a^*/b^* , o croma C^* (Eq. 2), o ângulo de matiz – Hue° (Eq. 3), e a variação de cor (ΔE) desde o dia inicial até o final do experimento (Eq. 4) (PERALTA-RUIZ *et al.*, 2020).

$$C^*_{ab} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\text{Hue}^\circ = \tan^{-1}\left(\frac{b}{a}\right) \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (\text{Eq. 4})$$

6.1.6.3.3. Teste mecânico de textura em bananas

O teste mecânico de textura utilizado para avaliar bananas tratadas e de controle foi o teste de punção por perfuração. Esse teste foi realizado em uma Máquina Universal de Testes ou texturômetro (modelo TATX plus, Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra) no Laboratório de Engenharia de Processos (LEP/FEA/UNICAMP). A resistência à penetração das bananas foi estudada utilizando uma sonda mecânica cilíndrica de fundo plano e 6 mm de diâmetro, a uma velocidade de teste de 1 mm s^{-1} e uma distância de penetração de 15 mm (Figura 16). A resistência à penetração ou a força máxima de penetração, expressa em Newton (N), foi definida como a média das 15 forças máximas necessárias para penetrar a banana a 6 mm. A perfuração foi realizada nas cascas de 6 bananas de cada tratamento em três pontos separados e padronizados (lateral perto do ápice, centro, lateral perto do pêndulo). As análises foram realizadas nos dias 0, 5 e 10 do armazenamento das bananas.



Figura 16 - Texturômetro perfurando uma banana tratada. **Fonte:** Autor.

6.1.6.3.4. Sólidos solúveis totais

Três frutas de cada tratamento previamente analisadas no teste mecânico de textura foram selecionadas aleatoriamente para serem trituradas em um liquidificador portátil (sem adição de água) para obter um suco de fruta que posteriormente foi analisado quanto ao SST, pH e à acidez titulável. O teor de SST foi determinado com um refratômetro portátil (KASVI, K52-032) em uma escala de 0 a 32%, calibrado com água destilada de acordo com a AOAC 932.12. A porcentagem média de SST é expressa em °Brix das três medições de cada suco de fruta por grupo nos dias 0, 5 e 10 de estocagem.

6.1.6.3.5. Potencial hidrogeniônico

O potencial hidrogeniônico (pH) de cada uma das amostras de suco de banana durante os três períodos durante a estocagem foi determinado usando um medidor de pH (modelo MB-10; Marte, São Paulo, Brasil) calibrado com tampões de pH 7,0 e 4,0. As medições foram realizadas três vezes para cada suco de fruta triturado.

6.1.6.3.6. Acidez titulável

A acidez titulável (AT) das amostras de bananas tratadas com emulsões e de controle foi analisada periodicamente baseado pelo método reportado por Nielsen (2017) com

algumas modificações. Inicialmente, 6 mL de suco de banana foram adicionados a 15 mL de água destilada em 3 béqueres diferentes de 50 mL para obter 3 subamostras por fruta. Depois, 3 gotas de solução de fenolftaleína a 1% foram adicionadas a cada subamostra de suco e agitadas vigorosamente. Usando uma bureta preenchida com uma solução padronizada de NaOH (0,1 N), as subamostras foram tituladas até que fosse observada uma mudança de cor de transparente para rosa, momento em que o ponto final da titulação foi determinado. Esse ponto de titulação foi monitorado com um medidor de pH até que a solução atingisse um pH de 8,2. A acidez foi determinada como a porcentagem de ácido cítrico (%) de acordo com a Eq. 5 proposta por Nielsen (2017).

$$AT (\% \text{ ácido cítrico}) = \frac{(mL \text{ base titulavel}) \times (N \text{ da base em mol /L}) \times (Eq.wt.acido)}{(Volume \text{ da amostra em mL}) \times 10} \quad (Eq. 5)$$

6.2. METODOLOGIA DO ESTUDO 2

A Figura 17 mostra o esquema experimental desenvolvido no *Estudo 2*, indicando os diferentes subobjetivos por etapas e seus respectivos processos e atividades.

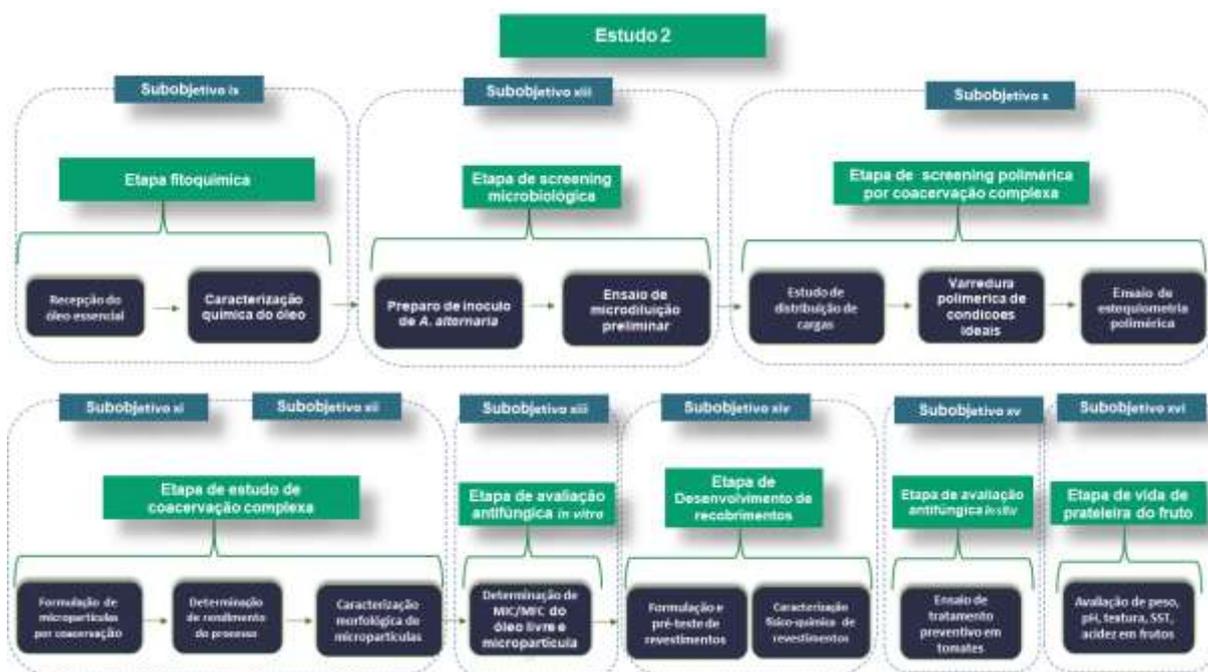


Figura 17 – Esquema experimental do Estudo 2.

6.2.1. ETAPA FITOQUÍMICA

6.2.1.1. Recepção do óleo essencial

O óleo essencial de estudo obtido de folhas da espécie aromática *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. foi doado em cooperação técnica entre a Universidade Federal Fluminense e um produtor agrícola do município de Bom Jardim, Estado do Rio de Janeiro. De acordo as informações proporcionadas, a coleta do material folhar de *C. citratus* foi realizada em junho de 2019, sendo este submetido a destilação por arraste de vapor para a obtenção do óleo essencial de *C. citratus* (OECc).

6.2.1.2. Caracterização química do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*

A identificação e a caracterização química dos componentes do óleo essencial de *C. citratus* foram realizadas por CG/EM e CG/DIC, respectivamente, conforme indicado na Subseção 6.1.1.3.

6.2.2. TESTE DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA SOBRE O PATÓGENO DA PINTA PRETA

6.2.2.1. Preparo do inóculo de *Alternaria alternata*

A cepa CCT 1250 do fungo *Alternaria alternata*, adquirida da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação de Pesquisa André Tosello e mantida na coleção do Laboratório de Microbiologia de Alimentos I da Universidade Estadual de Campinas, foi usada nos experimentos. Suspensão de conídios do fungo filamentosso *A. alternata* foram preparados em meio nutriente ágar polpa de tomate (APT) em placas de Petri estéril por 10 d de incubação a 28 °C. Após o tempo de crescimento, foram adicionados 10 mL de Tween 80 0,01% (v/v), e a superfície das placas foi raspada para obter um sobrenadante que foi filtrado e coletado para infecção celular. Os conídios da suspensão fúngica de *A. alternata* foram quantificados em uma câmara de Neubauer em microscópio óptico (objetiva de 40x), determinando a concentração celular expressa em conídios mL⁻¹ (Ver 6.1.2.1.).

6.2.2.2. Ensaio de microdiluição do óleo essencial de *C. citratus*

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de folhas de *C. citratus* foi determinada pelo teste de microdiluição descrito na seção 6.1.5.2. Em placas de 96 poços estéreis foi adicionado meio nutritivo RPMI 1640 e o óleo essencial a fim de obter concentrações seriadas de 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125, 0,00625, 0,003125, e 0,00156% (v/v). Adicionalmente, os micropoços testes foram inoculados com esporos de *A. alternata* na concentração de 1×10^6 conídios mL⁻¹. O esquema experimental também considerou micropoços de controle de crescimento fúngico (na ausência do óleo essencial) e de esterilidade (sem inoculação). As placas foram seladas e incubadas a 25 °C em estufa de incubação. O crescimento foi identificado pela mudança de cor no meio (de rosa a amarelo) e foi monitorado após 5 d. Os micropoços onde se mantinha uma coloração rosa foram considerados para determinar a CIM. A concentração fungicida mínima foi determinada inoculando o conteúdo dos micropoços sem crescimento em meio nutritivo de ágar polpa de tomate solidificado em placas de Petri seguido de incubação a 28 °C e 2 d. A concentração mínima a partir da qual não houve crescimento em placa de Petri foi considerada a CFM.

6.2.3. ETAPA DE SCREENING POLIMÉRICA POR COACERVAÇÃO COMPLEXA

6.2.3.1. Materiais e reagentes

Para escolher um par polimérico ideal para a encapsulação do óleo promissor do *Estudo 2*, os biopolímeros quitosana (QUI), alginato de sódio (ALG), amido de mandioca (AM), gelatina tipo A (GEa) e tipo B (GEb), proteína de ervilha (PEA) e goma arábica (GA) foram testados durante a fase de screening polimérica. A quitosana não purificada (Polymar Ciência e Nutrição, 20100210, grau de acetilação = 89%, PM = 69.000 g/mol) foi preparada em ácido acético glacial diluído (1% v/v). O alginato de sódio (GastronomyLab, 387 mPa.s, M/G <0,8 – nomeado neste estudo como *alginato 387 – ALG.387*), o alginato de sódio (FMC BioPolymer NF Manugel DMB, 300 mPa.s; nomeado como *alginato 300. ALG.300*), o amido de mandioca (Ingredion Brasil), a gelatina alimentícia tipo A (Gelita South America), gelatina tipo B de pele bovina (força do gel 244 bloom, LF 21502/04, Gelita South

America), a proteína de ervilha (Ingredion, Brasil) e a goma arábica (IRX49345, Colloides naturels Brasil Comercial Ltda, $300.000 \text{ g mol}^{-1}$) foram dissolvidos em água deionizada.

6.2.3.2. Distribuição de cargas

A determinação do potencial zeta foi usado para quantificar a densidade de carga superficial de cada solução polimérica. As soluções de alginato 387 (ALG.387) e alginato 300 (ALG.300), quitosana, amido de mandioca e gelatina tipo B foram preparadas a 0,1% (m/m) e homogeneizadas por agitação constante durante 15 h antes do ensaio para garantir total hidratação dos polímeros. A densidade de carga dos biopolímeros foi determinada nas soluções poliméricas que apresentaram diferentes variações de pH usando o equipamento modelo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd em Malvern, Worcestershire, Reino Unido). O pH das soluções poliméricas foi ajustado manualmente por titulação adicionado ácido clorídrico HCl (1, 0,1 e 0,01 M) ou hidróxido de sódio NaOH (1, 0,1 e 0,01 M). Durante todo o experimento, as soluções foram mantidas em agitação a 40 °C e as leituras foram feitas em intervalos regulares com três repetições.

6.2.3.3. Varredura polimérica para coacervação complexa

Para determinar as condições ideais para o encapsulamento do óleo essencial por coacervação complexa, foram testados diferentes biopolímeros e parâmetros. O processo de coacervação complexa realizado durante a triagem polimérica foi descrito por Gonçalves *et al.* (2017) e Prata e Grosso (2015) (Ver secção 6.2.2.6). Dentro do processo físico-químico da coacervação complexa, distinguem-se uma fase polimérica emulsificante, uma fase polimérica complexante em proporções de volume/massa específicas, um núcleo ou ingrediente ativo e um agente usado para ajustar a solução ao pH de coacervação (pH_c) definido pela distribuição de cargas. Devido à limitação da quantidade do óleo essencial promissor (*C. citratus*), os experimentos de triagem de coacervação complexa foram realizados usando óleo de resina de páprica (*Capsicum annuum*) em óleo de girassol (1,25%) como o núcleo das micropartículas iniciais. Os biopolímeros testados como material de parede de coacervação complexa foram os seguintes: quitosana (QUI), alginato 378 (ALG.378), alginato 300 (ALG.300), amido de mandioca (AM), gelatina tipo A (GEa), gelatina

tipo B (GEb), goma arábica (GA), proteína de ervilha (PEA). Diferentes formulações foram testadas considerando os resultados experimentais do potencial zeta (potencial ζ) de cada solução polimérica (6.2.2.2) e aqueles relatados em estudos anteriores. O Quadro 4 indica os biomateriais e as condições investigadas no presente estudo para microencapsular um núcleo oleoso e escolher uma formulação ideal. Os sistemas ou formulações foram avaliados considerando a capacidade de emulsificação do óleo, a separação de fases e a encapsulação do óleo verificada por microscopia ótica.

Quadro 4 - Condições experimentais de coacervação complexa no presente estudo

ID	Fase emulsificante	Fase complexante	Razão	pHc	Ácido	STfx	Referencia (Teórica ou experimental)
F1	GEb	GA	1:1	4,0	HCl (1 M)	2,5%	(GONÇALVES <i>et al.</i> , 2017)
F2	QUI	ALG.387	1:1,3	4,0	HCl (1 M)	1,25%	(45 mV/-57 mV)
F3	AM	ALG.387	10:1	4,0	HCl (1 M)	1,25%	(-4,58 mV/-57 mV)
F4	ALG.387	AM	1:10	4,0	HCl (1 M)	1,25%	(-57 mV/-4,58 mV/)
F5	PEA	ALG.387	3:1	4,0	HCl (1 M)	1,25%	(18 mV*/-57 mV)
F6	QUI	AM	1:9	4,0	HCl (1 M)	2,5%	(45 mV/-4,58 mV)
F7	ALG.387	PEA	1:3	4,0	CH ₃ COOH (5%)	1,25%	(-57 mV/18 mV*)
F8	GEa	ALG.387	3,2:1	4,0	HCl (1 M)	1,25%	(17 mV*/-57 mV)
F9	GEa	ALG.387	3,2:1	4,0	CH ₃ COOH (5%)	1,25%	(17 mV*/-57 mV)
F10	GEa	ALG.387	3,5:1	3,75	CH ₃ COOH (5%)	1,25%	(DEVI; KAKATI, 2013)
F11	GEb	ALG.387	4,5:1	4,20	CH ₃ COOH (5%)	1,25%	(12 mVa/-57 mV) ^a
F12	GEb	ALG.300	4,5:1	4,15	CH ₃ COOH (5%)	1,25%	(12 mVa/-57 mV) ^a
F13	GEb	ALG.300	5:1	4,0	CH ₃ COOH (5%)	1,50%	(10 mV/-50 mV)

STFx: sólidos totais fixos; Biopolímeros - QUI: quitosana, GA: goma arábica, ALG.378; alginato 378, ALG.300: alginato 300, AM: amido de mandioca, GEa: gelatina tipo A, GEb: gelatina tipo B, PEA: proteína de ervilha. pHc: pH de Coacervação; *Dados experimentais do grupo não publicados; ^a dados extraídos de Gonçalves (2016).

6.2.3.4. Determinação da estequiometria adequada entre os polímeros

Os materiais da parede e as condições ideais de coacervação complexa foram investigados a partir do resultado do potencial zeta de cada polímero de maneira experimental. A partir da distribuição de carga foi definido um valor de pH específico e uma proporção de um polímero emulsificante e um polímero complexante para determinar as condições ideais de complexação como pH de coacervação (pH_c), sólidos fixos totais (ST_{fx}) e proporção ideal para coacervação complexa do óleo essencial de *C. citratus*. Soluções dos biopolímeros Alginato 300 (ALG.300) e gelatina tipo B (GEb) a 1% foram homogeneizadas em água destilada 15 h antes do ensaio nas proporções 1:4,5 e 1:5. Um volume de 5 mL de cada solução dos polímeros foi misturado em um béquer de 50 mL por agitação magnética a 45 °C e o pH de cada sistema foi ajustado a 4,0, 4,15, e 4,25 com ácido acético glacial 5%. Após ajuste do valor de pH das soluções, a absorbância de cada sistema polimérico foi medida na faixa de comprimento de onda de 590 nm utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (T60 U PG Instruments Limited, Reino Unido) (GONÇALVES, 2016).

6.2.3.5. Formulação de micropartículas por coacervação complexa

Para preparar as micropartículas bioativas, foi aplicada a metodologia descrita por Gonçalves *et al.* (2017) e Prata e Grosso (2015) com algumas modificações. Inicialmente, uma solução de 100 mL dos pares poliméricos gelatina tipo B (GEb) e alginato 300 (ALG.300) na proporção de 5:1 foram preparadas em béquer de 250 mL em uma concentração de 1,80% p/p em água deionizada estéril e foram mantidas sob agitação em agitadores magnéticos (IKA | C-MAG HS 7) por 15 h. Antes de iniciar o experimento, as soluções foram aquecidas a 45 °C para assegurar a homogeneização completa dos polímeros. Depois, o óleo essencial de *C. citratus* (OECc) foi adicionado à fase emulsificante, gelatina tipo B (GEb) nas concentrações de 0,50 e 0,25%. Essa nova mistura foi homogeneizada em um homogeneizador Ultra Turrax a 14.000 rpm por 3 min. Em seguida, a mistura homogeneizada foi adicionada lentamente a 100 mL da solução complexante (ALG.300) a 45 °C. A solução foi mantida sob agitação constante e o pH foi ajustado para 4,0 com a adição de ácido acético glacial - CH₃COOH (5%, v/v). Depois disso, 600 mL de água deionizada aquecida a 50 °C foi adicionada ao sistema. A suspensão dispersante foi mantida em agitação magnética durante toda a formação da partícula. Esta solução dispersante foi resfriada a 10 °C usando um banho de gelo por 45 min. Em seguida, a solução foi colocada em repouso a 10 °C por 16 h. As partículas foram separadas da suspensão aquosa. Desta maneira, foram

obtidas as micropartículas p.0,50% (contendo 0,50% do óleo essencial de *C. citratus*) e as micropartículas p.0,25% (contendo 0,25% do óleo essencial de *C. citratus*) em função do potencial fungistático do derivado vegetal estudado (GONÇALVES, 2016).

6.2.3.6. Determinação da eficiência de coacervação

Inicialmente, para calcular o rendimento do processo de coacervação foi determinada a massa total de partículas e água contida no béquer. Depois, a fase precipitada, que corresponde às micropartículas foi cuidadosamente separada do sobrenadante que foi vertido e desprezado. Este processo foi repetido para que as partículas se compactassem ainda mais e expulsassem o solvente. A massa das micropartículas (fase coloidal) foi determinada em balança analítica (UX420H Marte). O conteúdo de umidade das micropartículas foi determinado em triplicata. Uma massa de aproximadamente 2 g de partículas úmidas foi pesada em placa de Petri previamente tarada, e a avaliação da massa de partículas secas após terem permanecido a 70 °C em estufa a vácuo por 24 h. A porcentagem do teor de sólidos totais (ST) presentes nas alíquotas de partículas foi calculada de acordo a **Eq. 6**.

$$\text{Teor de ST(\%)} = \frac{(\text{Massa da amostra seca})}{(\text{Massa da amostra de partícula})} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

Por meio dos dados de porcentagem de sólidos totais presentes nas partículas é possível determinar o rendimento do processo de coacervação que expressa a relação de material seco precipitado em relação a massa de sólidos secos iniciais (polímeros e óleos) adicionados ao sistema conforme a **Eq. 7**.

$$\text{Rendimento de coacervação} = \frac{(\text{Massa coacervado} * \% \text{ ST})}{\text{Massa de sólidos inicial}} \quad (\text{Eq. 7})$$

Posteriormente, foi necessário determinar a relação entre a massa de óleo contida em um grama de partícula úmida que é conhecida como *Load* (**Eq. 8**). Desta maneira, a eficiência do processo de complexação (EPC) dos polímeros é calculada considerando a massa de coacervado obtido junto com o *Load* (**Eq. 9**).

$$\text{Load} = \frac{(\text{massa do óleo total})}{(\text{massa da partícula úmida})} \quad (\text{Eq. 8})$$

$$\text{EPC} = \frac{(\text{massa coacervado} * \text{Load})}{(\text{massa inicial de polímeros})} \quad (\text{Eq. 9})$$

6.2.3.7. Caracterização morfológica das micropartículas e a verificação qualitativa de encapsulação

A morfologia e a encapsulação do óleo nas micropartículas úmidas foram determinadas por microscopia ótica com câmera digital incorporada (ZIE) com a objetiva de 10x. Adicionalmente, por métodos de espectrofotometria e cromatografia foi avaliada qualitativamente a presença do óleo essencial promissor dentro das micropartículas formadas. Inicialmente, 2 g de micropartículas (p.0,50% de OECc) foram secas em uma estufa a 40 °C por 24 h. Após, os sólidos foram triturados em um almofariz utilizando 5 mL de diclorometano Grau HPLC (Sigma-Aldrich). O sobrenadante foi extraído usando uma seringa com um filtro de 0,22 µm (Millipore) acoplado à sua extremidade fina. Este processo foi repetido até obter 30 mL do sobrenadante. A encapsulação de óleo no lote da micropartícula p.0,50% foi medida em triplicata (GONÇALVES *et al.*, 2017). Depois, varreduras de espectro dos sobrenadantes, o óleo essencial de *C. citratus* (30 µg mL⁻¹) e o padrão citral (30 µg mL⁻¹) dissolvidos em diclorometano foram feitas no Espectrofotômetro UV-Visível Shimadzu (2600 UV-Vis). Da mesma forma, uma alíquota de 1 mL dos sobrenadantes das micropartículas e do citral foram injetadas no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa (CG-EM QP 2010 Ultra Shimadzu) seguindo as condições descritas na seção 6.1.1.3.

6.2.3.8. Tamanho das partículas e a distribuição de tamanho

O tamanho médio das partículas úmidas foi determinado utilizando o princípio de espalhamento de luz de laser (Mastersizer 2000, Malvern, Alemanha) com a unidade de suspensão de amostra onde quantidades de micropartículas foram suspensas em água destilada ajustando-se estas quantidades para um nível adequado de refração para a

detecção do equipamento. Cada valor foi resultado de triplicata. Os dados do diâmetro de volume médio de micropartículas ($D_{4,3}$) e da largura de distribuição das micropartículas (Span) foram calculados pelo software do equipamento.

6.2.3.9. Determinação do potencial fungistático e fungicida do óleo livre e encapsulado

A atividade antifúngica do óleo essencial livre de *C. citratus* e encapsulado por meio de micropartículas sob o fungo *Alternaria alternata* foi determinada pelo ensaio de microdiluição de acordo com o item 6.2.2.2. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram determinadas por mudanças de cor do meio nutriente líquido RPMI 1640 após 5 d de incubação das placas a 28 °C enquanto as concentrações fungicidas mínimas (CFM) foi determinada pelo crescimento fúngico observado a partir de re-inoculação em meio nutriente solidificado em triplicata para cada concentração.

6.2.4. ETAPA DE DESENVOLVIMENTO DE RECOBRIMENTOS COMESTÍVEIS

6.2.4.1. Preparação do revestimento

O revestimento foi preparado pelo método *casting* baseado em Guimarães *et al.*, (2024) com modificações. Os revestimentos comestíveis ou emulsões formadoras de filme (EFF) foram preparados com base no biopolímero fécula de mandioca National Frigex® (Ingredion), junto com o plastificante glicerol, o emulsificante Tween 80 e o óleo essencial microencapsulado ou livre de *C. citratus*. 500 mL de solução de dispersão foi preparada dissolvendo-se 4% (m/v) de fécula de mandioca em água milli-Q estéril sob agitação e aquecimento até a gelatinização a 70 °C por 12 min. Em seguida, 30% de glicerol (m/m) em relação ao biopolímero foi adicionado à EFF sob agitação, mantendo a temperatura a 70 °C por 15 min. Depois, a EFF foi resfriada a 35 °C para a adição dos coacervados ou do óleo essencial de *C. citratus* livre, misturados com 2% (m/m) de Tween 80 (em relação a concentração do óleo). As EFF foram homogeneizadas vigorosamente (visando formação de vórtex) em uma placa de agitação por 10 min sem aquecimento. Diferentes filmes foram preparados para os testes experimentais em frutas de acordo com o Quadro 5. As EFF foram mantidas refrigeradas até a aplicação nas frutas.

Quadro 5 – Formulações de revestimentos comestíveis

Revestimento	Biopolímero	Plastificante	Ingrediente ativo	Emulsificante
EFF1	20 g	6 g	12 g micropartícula p.0,50%	0,005 g
EFF2	20 g	6 g	12 g micropartícula p.0,25%	0,005 g
EFF3	20 g	6 g	0,25 % de óleo essencial de <i>C. citratus</i>	0,005 g
EFF4	20 g	6 g	12 g micropartícula sem óleo essencial	0,005 g

EFF: Emulsão formadora de filme; *p.0,50%*: micropartícula contendo 0,50% de óleo essencial de *C. citratus*; *p.0,25%*: micropartícula contendo 0,25% do óleo essencial de *C. citratus*.

6.2.4.2. Ensaio da uniformidade do recobrimento

Diferentes formulações foram realizadas para definir a metodologia apropriada para a produção de emulsões formadoras de filme (EFF) adequadas para o revestimento de tomates (Apêndice 2). Desta maneira, a adesão e a homogeneidade das diferentes formulações foram avaliadas por meio do teste de iodo-amido descrito por Gomes Filho et., (2016) com modificações. Tomates previamente lavados e sanitizados (conforme a Seção 6.2.4.1) foram submersos duas vezes por 2 min com pinças esterilizadas em 500 mL de cada formulação de revestimento. Em seguida, foram secos em temperatura ambiente por 30 min. Os tomates foram borrifados com solução de iodo para verificar a presença de amido. A mudança de cor dos frutos para uma cor preta foi o indicador para avaliar a uniformidade da aplicação do revestimento. O número de aplicações (1, 2 e 3 vezes por 2 ou 5 min) que seriam necessárias submergir os frutos para revesti-los de forma homogênea nos ensaios de avaliação *in situ* também foi verificado por esse método qualitativo.

6.2.4.3. Caracterização físico-química dos revestimentos

As emulsões formadoras de filme (EFF) preparadas foram caracterizadas por medições do tamanho das partículas, pH, viscosidade e densidade relativa de acordo com Peralta-Ruiz *et al.* (2020).

6.2.4.3.1. Tamanho da partícula

O diâmetro médio do volume - $D_{4,3}$ e a distribuição das partículas (span) das diferentes EFF foram determinados usando um Mastersizer 2000 (Malvern, Alemanha), conforme descrito na Seção 6.2.3.9.

6.2.4.3.2. pH

O pH de cada EFF a 25 °C foi determinado com um pHmetro em triplicata. O equipamento foi previamente calibrado com tampões de pH 7,0 e 4,0.

6.2.4.3.3. Viscosidade

A viscosidade relativa de cada EFF foi determinada por meio de um reômetro de tensão controlada (AR1500ex, TA Instruments, New Castle, DE, EUA) equipado com uma geometria cone placa de ângulo de 2° de aço inoxidável com diâmetro de 40,0 mm e gap de 53 microns. As curvas de fluxo para as emulsões formadas por filme foram obtidas em taxas de cisalhamento variando de 0 a 300 s⁻¹ a 25 °C. A viscosidade na taxa de cisalhamento de 100 s⁻¹ foi considerada para cada EFF de acordo com Peralta-Ruiz *et al.* (2020). Foram realizadas três rampas para cada EFF.

6.2.4.3.4. Densidade relativa

A densidade relativa de cada emulsão formadora de filme - EFF foi determinada pela AOAC 920.212:1995 e ISO 279:1998. Um picnômetro de 50 mL limpo e vazio foi pesado em uma balança analítica e, em seguida, preenchido com cada EFF e pesado novamente. A densidade relativa ρ (expressa em kg m⁻³) das EFFs foi calculada de acordo com a **Eq. 10**.

$$\rho = \frac{(\text{peso picnometro+EFF}) - (\text{peso picnometro vazio})}{\text{volume do EFF}} \quad (\text{Eq. 10})$$

6.2.5. ETAPA DE ENSAIOS *IN SITU*

6.2.5.1. Seleção e acondicionamento de frutos

Tomates de cultivar italiano foram adquiridos na Central de Abastecimento da cidade de Campinas (CEASA, SP). Para garantir a qualidade ideal, os frutos foram selecionados manualmente e classificadas com base em seu tamanho e cor da casca. Foram selecionados apenas os frutos com nível de maturação entre 50 e 70%, sem defeitos fisiológicos, lesões ou infecções detectáveis por microrganismos. Os frutos foram então transportados para o Laboratório de Inovação de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas em sacolas plásticas, a uma temperatura de aproximadamente 25 °C. Os frutos foram lavados com detergente, submergidos em solução de hipoclorito 1% durante 10 min, lavados com água deionizada novamente e secos a temperatura ambiente. Após desinfecção, os frutos foram armazenados a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ por no máximo 2 d para manter a integridade dos frutos. Os frutos foram usados como modelo para a realização de dois diferentes ensaios de avaliação dos revestimentos produzidos (EFF): ensaio de tratamento curativo e ensaio de vida de prateleira do tomate (*shelf life*).

6.2.5.2. Ensaio antifúngico artificial em tomates

Este experimento visou avaliar o efeito curativo das diferentes emulsões formadoras de filme (EFF) sobre tomates revestidos quando estes foram posteriormente infectados artificialmente com conídios do fungo *A. alternata* durante estocagem controlada. O ensaio teve um desenho experimental formado por cinco grupos de tomates com 10 unidades ($n = 10$) cada um, distribuídos de maneira aleatória. Os diferentes grupos experimentais deste experimento são apresentados na Quadro 6.

Quadro 6 - Grupos experimentais dos ensaios de revestimento em tomates

Grupo	Tratamento	Número de frutos por experimento	
		Ensaio antifúngico artificial em tomates	Ensaio de vida de prateleira de tomates
Grupo 1	Tomates revestidos com a EFF1 (micropartículas p.0,50%)	10	24
Grupo 2	Tomates revestidos com a EFF2 (micropartículas p.0,25%)	10	24
Grupo 3	Tomates revestidos com a EFF3 (óleo livre <i>C. citratus</i> 0,25%)	10	24
Grupo 4	Tomates revestidos com a EFF4 (micropartículas sem OE)	10	24
Grupo 5	Tomates não revestidos	10	24

EFF: Emulsão formado de filme; OE: óleo essencial; *p.0,50%*: micropartícula contendo 0,50% de óleo essencial de *C. citratus*; *p.0,25%*: micropartícula contendo 0,25% do óleo essencial de *C. citratus*. (Informação sobre os tratamentos veja o Quadro 5).

6.2.5.2.1. Aplicação dos revestimentos

Os tomates desinfetados e secos foram separados em copos de plásticos de 80 mL e expostos em UV durante 15 min em uma cabine de biossegurança no Laboratório de Microbiologia de Alimentos I (FEA/UNICAMP) para assegurar sua esterilidade. Depois, os tomates foram totalmente imersos em cada emulsão formadora de filme (EFF) durante 2 min com 3 repetições e drenados por 2 min. Os tomates foram então colocados novamente nos copos de plásticos para secagem por 2 h na cabine de biossegurança.

6.2.5.2.2. Ensaio de contaminação artificial em frutos

O ensaio de avaliação preventiva dos revestimentos foi realizado seguindo a metodologia de Fagundes *et al.* (2013), com algumas modificações. Após a secagem dos revestimentos, todos os tomates dos diferentes grupos foram feridos superficialmente no equador do fruto com a ponta de um bisturi de aço inoxidável estéril com 5 mm de diâmetro. A ferida foi inoculada com 10 µL de uma suspensão de conídios de *A. alternata* (consulte a seção 6.2.2.2.) em meio nutritivo RPMI 1640 contendo uma concentração de 1×10^6 conídios mL⁻¹. Os tomates com seus respectivos suportes (copos de plástico) foram então distribuídos

aleatoriamente em caixas de armazenamento de plástico de polietileno com tampas (40,5 x 25,8 x 13,6 cm), previamente desinfetadas e expostas a radiação UV. Estas caixas contendo os tomates dos diferentes grupos foram armazenados em uma incubadora BOD a 25 ± 1 °C e 70% de umidade relativa por 12 d de armazenamento.

A severidade da doença da pinta preta gerada pelo fungo *A. alternata* nos tomates foi monitorada aos 3, 6 e 9 d de incubação, medindo-se o diâmetro da lesão (mm) com o auxílio de um paquímetro digital. Todas as medições foram realizadas em uma sala previamente exposta a UV e próximos a um bico de Bunsen para evitar a contaminação microbiana das unidades de amostragem. Os resultados foram apresentados em porcentagem de redução da gravidade em comparação com os dados do grupo não tratado (Grupo 5). Os dados de gravidade foram usados para calcular a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de acordo com a Eq. 11 (HENDGES *et al.*, 2021).

$$\text{AUPDC} = \sum_{i=0}^n \left(\frac{Y_{i+n1} + Y_i}{2} \right) (X_i + 1 - X_i) \quad (\text{Eq. 11})$$

Onde, n = número de avaliações; Y_i = severidade da doença nas diferentes avaliações i^{th} ; X_i = tempo em dias de avaliação.

6.2.5.3. Ensaio de vida de prateleira de tomates revestidos

Para o teste do efeito dos revestimentos nos tomates durante o período de estocagem, foram usados 120 frutos. Os tomates desinfetados foram codificados e distribuídos aleatoriamente nos respectivos 5 grupos experimentais, conforme mostrado na Tabela 6. Cada grupo foi constituído de 24 tomates que serviram como amostras independentes para avaliação e monitoramento em 0, 3, 6 e 9 dias de armazenamento em BOD a 25 °C. Os tomates foram revestidos por imersão durante 2 min em 3 aplicações. Em seguida, os tomates foram colocados para secar à temperatura ambiente (30 °C) em suportes por separado (copos plásticos) sem fluxo de ar. Após 3 h de secagem, os tomates foram armazenados em uma incubadora BOD no Laboratório de Inovação Alimentar (LINA/FEA/UNICAMP) a 25 °C por 9 d. Parâmetros como perda de peso, cor, textura, sólidos solúveis totais, pH e acidez titulável foram monitorados periodicamente durante o período de estocagem.

6.2.5.3.1. Análise instrumental de cor nos tomates

A cor instrumental dos tomates foi medida periodicamente nos dias 0, 3, 6 e 9 de armazenamento com um colorímetro calibrado (CM-2600D, iluminante D65 Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japão). As medições de cor produziram as coordenadas de luminosidade (L^*), verde-vermelho (a^*) e azul-amarelo (b^*) do sistema CIELAB (CIE, 1976; McLaren, 2008). As condições de medição estão descritas na Seção 6.1. Os estágios de maturação dos tomates foram determinados calculando-se o Croma (C^*_{ab}) (Eq. 2), o ângulo Hue ($^{\circ}\text{Hue}$) (Eq. 3) e a mudança de cor (Eq. 4, Veja 6.1.6.4.) ((PERALTA-RUIZ *et al.*, 2020).

6.2.5.3.2. Perda de peso do tomate

A massa dos tomates em cada um dos tratamentos ($n=6$) foi medida em uma balança analítica (modelo BG 4000, Gehaka Ltda, São Paulo, Brasil). Os dados foram avaliados como perda de peso percentual, que foi calculada como a razão entre o peso inicial e o peso final de cada tomate no final do tempo de armazenamento, de acordo com a **Eq. 12**.

$$\text{Perda de peso (\%)} = \frac{\text{peso final do fruto (g)} - \text{peso inicial do fruto (g)}}{\text{peso inicial do fruto (g)}} * 100 \quad (\text{Eq. 12})$$

6.2.5.3.3. Avaliação da textura nos tomates

A textura dos tomates foi estudada utilizando o texturômetro tipo Universal Testing Machine (modelo TATX plus, Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra). A resistência das amostras à penetração foi determinada através de ensaio de punção, utilizando um probe cilíndrico de aço inoxidável com base plana de 2 mm de diâmetro. A força máxima de penetração, expressa em Newton (N), foi definida como a média de quinze forças máximas necessárias para que o probe penetrasse 15 mm em tomates a uma velocidade de 2 mm s^{-2} (FONTES, 2005; GARCIA, 2009). Três punções em diferentes pontos dos tomates de maneira padronizada foram realizados em cada fruto testado. Seis frutos foram analisados por cada grupo durante os dias 0, 3, 6, e 9 de estocagem.

6.2.5.3.4. Análises de sólidos solúveis totais

Os sólidos solúveis totais (SST) de três frutos independentes de cada grupo previamente perfurados no ensaio de textura foram analisados em cada período de monitoramento. Cada fruto foi triturado por separado em um liquidificador portátil sem a adição de água destilada para posterior provas físico-químicas. O teor de sólidos solúveis totais foi determinado com um refratômetro manual modelo (KASVI, K52-032), em uma escala de 0 a 32%, e calibrado com água destilada AOAC 932.12.

6.2.5.3.5. Medições de pH

O pH das amostras do suco de tomate (sem adição de água destilada) foi determinado utilizando um pHmetro (modelo MB-10; Marte, São Paulo, Brasil) calibrado com tampões de pH 7,0 e 4,0. As análises foram realizadas no dia 0, 3, 6, e 9 de estocagem.

6.2.5.3.6. Análises de acidez titulável

As amostras dos tomates tratados com os revestimentos foram analisadas seguindo a metodologia de Nielsen (2017) com algumas modificações (Ver 6.1.6.8). De maneira geral, um volume de 150 mL de água destilada foi adicionado a 20 mL do suco triturado de cada fruto analisado. Esta mistura foi homogeneizada em liquidificador portátil durante 30 s e depois foram separados 30 mL desta suspensão em Erlenmeyer de 250 mL para obter subamostras. A cada amostra de suco foram adicionadas 6 gotas de solução de fenolftaleína a 1% e cada solução foi agitada vigorosamente. Usando uma bureta com solução padronizada de NaOH (0.1 N) as amostras foram tituladas até a observar a alteração de cor de transparente a rosa onde e observar um pH de 8,2. As medições de acidez foram realizadas a partir de 3 frutos independentes de cada grupo utilizados no ensaio de textura nos dias 0, 3, 6 e 9, sendo estes selecionados aleatoriamente para análises físico-químicas. A acidez titulável foi determinada em porcentagem de ácido cítrico (%) de acordo a Eq. 5.

6.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de ambos os estudos foram analisados no software Prism GraphPad (Chicago, EUA). Os dados foram submetidos à análise de normalidade pelo teste de

Anderson-Darling ($p < 0,05$). Os dados paramétricos com grupos de fator único foram analisados pela análise de variância ANOVA com os respectivos pós-testes (Tukey, $p < 0,05$), expressando graficamente o valor médio e seu erro padrão da média (SEM). Enquanto isso, as diferenças entre os dados não paramétricos foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis a partir da mediana. Os dados com grupos de dois fatores, como parâmetros físico-químicos dos frutos, avaliando o tempo de armazenamento em cada tratamento, foram analisados por ANOVA bidirecional com comparações múltiplas, avaliando o efeito simples entre os tempos de armazenamento para cada grupo por meio do método pós-teste de Dunnett.

6.4. CONSIDERAÇÕES SOBRE ASPECTOS ÉTICOS E/ OU GESTÃO DO PATRIMÔNIO

As espécies vegetais de *Annona acutiflora* e *Xylopia ochrantha* estudadas no presente estudo foram coletadas do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba sob a Autorização de coleta N° 37006-5 SISBIO/ICMBio com fins acadêmicos e de pesquisa. O acesso às espécies vegetais utilizadas no projeto foi cadastrado no formulário de autorização n° A491A56 de acesso na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen. Também, o acesso ao patrimônio genético do fungo *Thielaviopsis ethacetica* isolado no território brasileiro foi registrado sob a autorização n° AAA459F no SisGen.

7. RESULTADOS

7.1. RESULTADOS DO ESTUDO 1

7.1.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS

A partir da análise CG-EM/DIC, foi possível caracterizar a composição química dos óleos essenciais de duas espécies Annonaceas (Ver Apêndice D). Inicialmente, 22 compostos foram identificados no óleo essencial das folhas de *A. acutiflora* (OEAA) coletado em março de 2023 no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. O óleo OEAA é predominantemente rico em sesquiterpenos hidrocarbonetos (83,9%) e apresenta uma baixa quantidade de sesquiterpenos oxigenados (5,2%) (Quadro 7). Os sesquiterpenos biclogermacreno e (E)- β -farneseno foram os principais componentes desse derivado com uma porcentagem relativa de 37,0 e 11,8%, respectivamente. Ao contrário do OEAA, o óleo essencial extraído da *X. ochrantha* (OEXO) tem diferentes monoterpenos de hidrocarboneto, mas sua classe predominante é a dos sesquiterpenos de hidrocarboneto. Esse óleo também tem o sesquiterpeno biclogermacreno (26,77%) como seu principal constituinte, mas seu segundo principal constituinte é o monoterpeno hidrocarboneto β -pineno (17,82).

Quadro 7 - Caracterização química dos óleos essenciais de folhas de *Annona acutiflora* (OEAA) e *Xylopia ochrantha* (OEXO) por CG/EM e CG/DIC

IA _{exp}	IA _{Lit}	Substância	Composição relativa (%)	
			OEAA	OEXO
935	932	α -pineno	-	0,68
943	945	α -fencheno	-	6,64
984	969	Sabineno	-	6,31
988	974	β -Pinene	-	17,82
1015	1008	δ -3-Carene	-	0,48
1026	1014	α -Terpinene	-	0,33
1038	1025	β -Phellandrene	-	3,92
1068	1054	γ -Terpinene	-	0,54
1337	1335	δ -Elemene	2,0	0,22
1348	1348	α -cubebene	-	7,42
1375	1374	α -Copaene	-	1,01
1392	1389	β -Elemene	3,5	0,97
1406	1405	Sesquithujene	0,8	-

1419	1417	(E)-caryophyllene	-	3,05
1415	1432	α -cis-Bergamotene	0,8	-
1420	1416	α -santalene	5,8	-
1434	1434	γ -elemeno	0,3	-
1436	1432	α -trans-bergamoteno	2,2	-
1439	1439	Aromadendrene	0,3	0,54
1460	1449	Spirolepechinene	-	0,35
1443	1449	Himachalene	0,4	-
1457	1454	(E)- β -farnesene	11,8	-
1460	1460	Dehydro-aromadendrane	3,2	-
1483	1479	α -curcumeno	0,2	-
1481	1480	Germacreno D	6,4	-
1488	1478	γ -Muuroleone	-	0,84
1489	1489	β -selinene	0,2	-
1492	1496	Valencene	-	15,72
1496	1500	Bicyclogermacreno	37,0	26,77
1504	1505	(E,E)- α -Farnesene	0,6	-
1509	1505	β -Bisabolene	3,3	-
1524	1521	β -sesquiphellandreno	3,0	-
1557	1559	Germacreno B	2,0	0,94
1578	1577	Spathulenol	2,3	3,21
1592	1590	Globulol	1,4	-
1640	1639	allo-Aromadendrene epoxide	1,5	-
Monoterpenos hidrocarbonetos			0	37,57
Monoterpenos oxigenados			0	0
Sesquiterpenos oxigenados			5,2	3,21
Sesquiterpenos hidrocarbonetos			83,9	58,05
Total identificado (%)			89,1	98,83

IA_{exp} : índice aritmético experimental; IA_{lit} : índice aritmético da literatura.

7.1.2. CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES ELABORADAS PELO MÉTODO DE BAIXO APORTE DE ENERGIA

Nanoemulsões dos óleos essenciais de *A. acutiflora*, *X. ochrantha* e *C.* foram preparadas pelo baixo aporte energético e caracterizadas por análise de espalhamento de dispersão de luz (DLS). A formulação 3 do óleo essencial de *A. acutiflora* apresentou uma aparência translúcida e homogênea. De acordo com a Figura 18, a formulação mostrou um tamanho médio de gotícula de óleo formadas na fase aquosa de 82,76 nm ($\sigma = 0.61$, Figura

18a) e um índice de polidispersividade de 0,248. Essa nanoemulsão apresentou um equilíbrio hidrófilo-lipofílico (EHL) de 16,7 e um potencial zeta médio de -26,85 mV (Figura 18b). Similarmente, a nanoformulação do óleo essencial de *X. ochrantha* com um BHL de 16,7 exibiu um tamanho médio das gotículas de óleo formadas na fase aquosa de 61,19 nm (Figure 18c), com um índice de polidispersividade de 0,238. Essa nanoemulsão homogênea apresentou um diferencial de carga de -25,16 mV, conforme visualizado na Figura 18d.

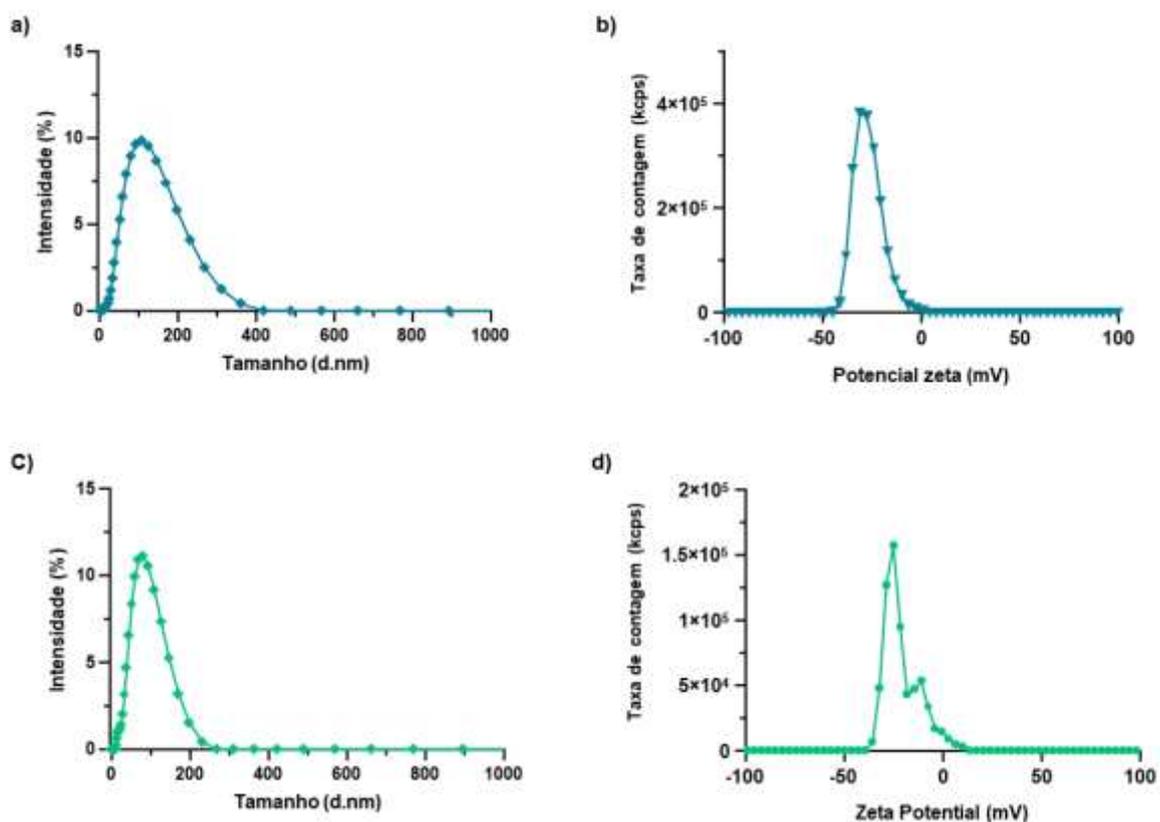


Figura 18 - Caracterização das nanoemulsões por DLS. Figura a e b representam o resultado gráfico das curvas de tamanho médio da gotícula (nm) e o potencial zeta (mV) da nanoemulsão do óleo essencial de *A. acutiflora* (OEAA-F3); figura c e d correspondem aos resultados gráficos das curvas de tamanho da gotícula (nm) e do potencial zeta (mV) da nanoemulsão do óleo essencial de *X. ochrantha* (OEAA-F3).

Por outro lado, as formulações preparadas a partir do óleo essencial de *C. citratus* (capim-limão) com valores de BHL de 16,7 a 11,74 apresentaram tamanhos de gotículas maiores que 200 nm e um valor de IPD superior a 0,3 (Tabela 1). Considerando, a formulação com menor tamanho de gotícula, a formulação F5 foi escolhida para ensaio antifúngicos.

Tabela 1- Caracterização de nanoemulsões do óleo essencial de *C. citratus* (Ne-OECc)

Formulação	Tamanho da gotícula Média em nm (σ)	IPD Média (σ)	EHL	Potencial Zeta Média (σ)
F1	283,2 nm (1,2)	0,279 (0,02)	16.7	-16,65 mV (0.314)
F3	254,0 nm (4,88)	0,291 (0,01)	14.22	-22,99 mV (1,68)
F5	131,3 nm (2,26)	0,519 (0,04)	11,74	-25,58 mV (1,191)
F10	921,2 nm (31,16)	0,598 (0,23)	11.74	-47,92 mV (0,01)

σ : desvio padrão, IPD: Índice de polidispersividade, EHL: equilíbrio hidrófilo-lipofílico; Ne-OECc: nanoemulsão do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

7.1.3. AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA PRELIMINAR DE DERIVADOS VEGETAIS CONTRA *T. ethacetica*

O efeito antagônico dos óleos *A. acutiflora*, *X. ochrantha* e *C. citratus* e as respectivas nanoemulsões de cada óleo essencial sobre o fungo fitopatogênico *T. ethacetica* foi avaliado por meio do método de microdiluição em uma placa de 96 poços. A Figura 19 apresenta o perfil antifúngico identificado para os óleos essenciais de *A. acutiflora* (OEAA), *X. ochrantha* (OEXO) e suas nanoemulsões. A Figura 19a mostra uma tendência de redução do efeito inibitório dos dois óleos sobre *T. ethacetica* (The) à medida que a concentração dos tratamentos diminui. O óleo essencial OEAA foi capaz de causar uma inibição de 74,99% em comparação com o óleo OEXO, com 54,17% na concentração máxima testada (10.000 ppm). A partir da análise de variância (ANOVA bidirecional), foi possível determinar que a interação entre os óleos essenciais e as concentrações testadas foi significativa. Embora o DMSO tenha reduzido 20% das células, ele não interferiu no efeito antagônico dos óleos essenciais, pois apresentou uma diferença estatística com valores de $p < 0,0001$ e $0,0008$ (consulte o Quadro E1 no Apêndice E). Além disso, foram observadas alterações de cor com o corante resazurina em todos os micropoços do tratamento branco da nanoemulsão e do óleo essencial de *X. ochrantha*, indicando uma atividade metabólica latente do fungo.

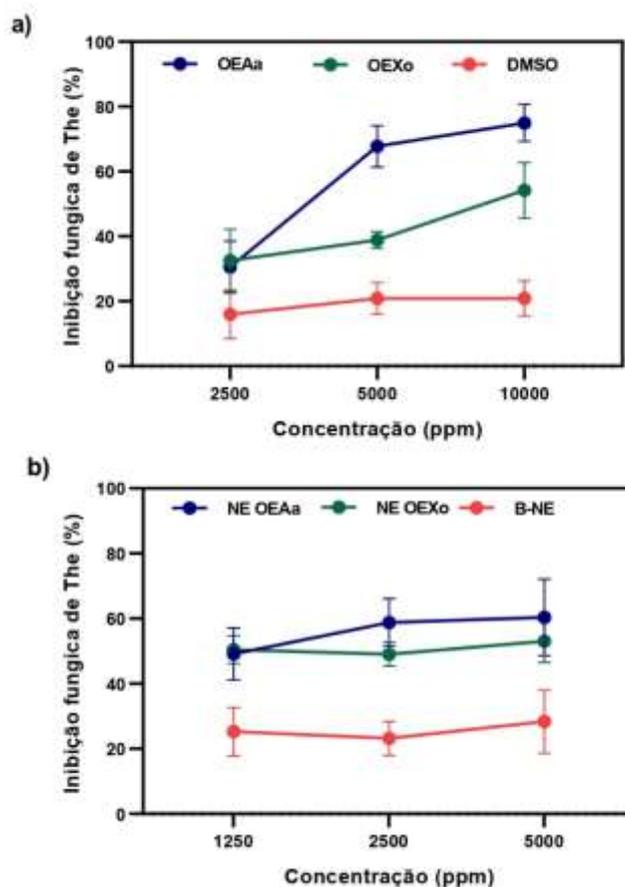


Figura 19 - Perfil antifúngico de nanoemulsões e derivados vegetais procedentes do PNRJ contra o fungo *T. ethacetica* (The). OEAa: óleo essencial de folhas de *Annona acutiflora*; OEXo: óleo essencial de folhas de *Xylopiya ochrantha*; NE OEAa: nanoemulsão do óleo essencial de *Annona acutiflora*; NE OEXo: nanoemulsão do óleo essencial de folhas de *Xylopiya ochrantha*; Concentração ppm (m/v).

Ao comparar o efeito das nanoemulsões em 72 h de incubação, pode-se identificar que 60% e 53% da inibição do crescimento fúngico foi alcançado em uma concentração de 5000 ppm de OEAa e OEXo emulsionados (Figura 19b). Não foram identificadas diferenças significativas para as concentrações de nanoemulsão, mas para o fator de tratamento nanoemulsionado (Quadro E2 do Apêndice E). O branco da emulsão (surfactantes usados) foi significativamente diferente das nanoemulsões dos óleos OEAa e OEXo. No entanto, após 96 h de incubação, foi observado crescimento fúngico com processos de esporulação devido à sua pigmentação acinzentada, o que poderia indicar um possível efeito fungistático dos tratamentos às 72 h de crescimento.

Por outro lado, foi identificado que o óleo essencial de *C. citratus* apresenta um perfil antifúngico bastante singular contra o fungo *T. ethacetica*. Percentagens de inibição acima

de 97% contra o desenvolvimento do patógeno-alvo foram observadas em micropoços contendo óleo essencial de *C. citratus* (capim-limão) em concentrações de 625 a 10.000 ppm (Figura 20). A porcentagem de inibição fúngica em micropoços com nanoemulsão a uma concentração de 2500 ppm foi somente do 17%, enquanto a 156 ppm atingiu 89% de inibição, o que demonstra um efeito inversamente proporcional entre a porcentagem de inibição e a concentração. A forma como as nanoemulsões atuam em altas e baixas concentrações contra o patógeno é desconhecida, portanto esta observação abre a porta para realizar futuros estudos de mecanismo de ação deste derivado emulsificado. Em termos gerais, a nanoemulsão do óleo essencial de capim-limão foi capaz de manter ou potencializar o perfil antifúngico do óleo, mesmo em concentrações mais baixas quando este foi exposto ao conídio do patógeno alvo.

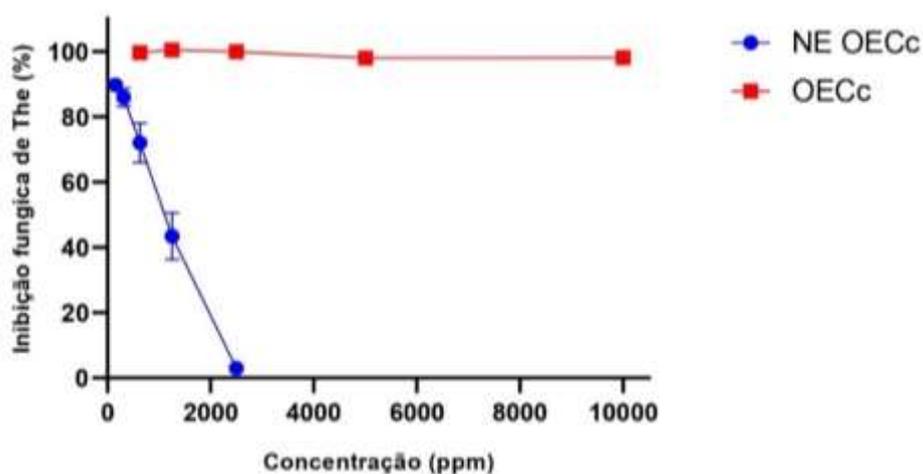


Figura 20 – Perfil antifúngico de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (OECc) e da nanoemulsão Ne-OECC (F5) contra *T. ethacetica*.

De maneira geral, nenhum dos derivados de plantas (*A. acutiflora*, *X. ochrantha* e *C. citratus*) em sua forma livre ou emulsificada tiveram a capacidade de interromper o crescimento micelial de *T. ethacetica* quando micélios previamente cultivados foram expostos a superfícies de placas contaminadas com cada um dos tratamentos. Assim, pode-se afirmar que estes compostos vegetais exercem só atividade fungistática sobre o fungo na forma de conídios.

7.1.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS EMULSÕES ELABORADAS PELO MÉTODO DE ALTO APORTE ENERGÉTICO

Com a hipótese de que a combinação de um composto principal com atividade microbiana amplamente descrita, como o cinamaldeído, com o óleo essencial de *A. acutiflora*, aumentaria o efeito antimicrobiano, foi idealizada uma emulsão combinada. Considerando que o cinamaldeído tem sido relatado com propriedades antifúngicas e é amplamente comercializado, este foi utilizado para a obtenção de emulsões. Também era necessário ter grandes volumes de tratamento emulsionado para sua aplicação em frutas grandes, como a banana, por isso se considerou emulsionar usando o método de alta energia. O Quadro 8 apresenta a caracterização de DLS das emulsões produzidas. A aparência da emulsão combinada contendo OEAA e cinamaldeído (E-AaCin) era turva com uma coloração de cinza claro. A emulsão de cinamaldeído tinha uma aparência azulada e homogênea. As emulsões primárias tinham tamanhos de gotículas acima dos 500 nm, distribuição não homogênea de gotículas com um IPD elevado e somente a emulsão combinada apresentou um diferencial de carga de mais de 30 mv em módulo, o que poderia definir sua estabilidade cinética.

Quadro 8- Caracterização de emulsões usadas no ensaio *in situ* pelo método DLS

Emulsões	Tamanho de gotícula	IPD	Potencial zeta	Visual
E-AaCin	2815,33 nm	1	-42,9 mV (3,8)	
E-Cin	651,13 nm	0,6	-20,7 mV (3,6)	

E-Cin: emulsão de cinamaldeído 5.000 ppm; E-AaCin: emulsão de *Annona acutiflora* misturada com cinamaldeído 1:1 - 5.000 ppm.

7.1.5. ATIVIDADE FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA DAS EMULSÕES

A atividade fungistática e fungicida das emulsões sobre os conídios de *T. ethacetica* foi determinada pelo método de microdiluição padronizado. A alteração do pH no meio nutritivo nos micropoços de 96 placas, expressa pela mudança de cor de rosa para amarelo, indicou o crescimento nos poços até determinadas concentrações de acordo com o tratamento. Essa mudança de cor no meio após 120 h de incubação a 25 °C possibilitou a definição das concentrações fungistáticas (CIM). Enquanto isso, a formação de colônias fúngicas em uma placa contendo meio nutriente solidificado a partir de alíquotas reinoculadas dos micropoços sem crescimento aparente possibilitou a determinação da concentração fungicida de cada tratamento (CFM). A Figura 21 mostra o perfil fungistático e fungicida das emulsões e seus derivados na forma pura. A emulsificação dos derivados vegetais oleosos de *A. acutiflora* e cinamaldeído permitiu obter um efeito fungistático e fungicida em concentrações mais baixas dos derivados vegetais do que na forma livre. A combinação dos dois derivados de plantas gerou o mesmo valor de CIM quando o óleo essencial foi aplicado puro. A emulsificação do cinamaldeído foi capaz de afetar a viabilidade celular do patógeno em uma concentração três vezes menor (500 ppm) em relação ao composto puro (CFM: 2000 ppm) (Figura 21). O cinamaldeído puro apresentou as maiores concentrações fungistáticas e fungicidas dos ensaios antifúngicos, mas em sua forma emulsificada foi capaz de afetar severamente o patógeno, resultando em valores de CIM e CFM de 125 ppm. Os micropoços de controle negativo (contendo Tween 80, a nanoemulsão em branco), e do controle de crescimento (apenas meio inoculado), apresentaram coloração amarela após o período de incubação, demonstrando que o fungo se desenvolveu.

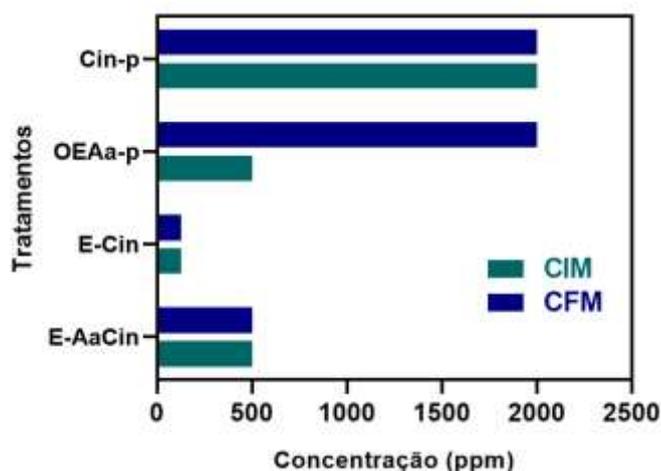


Figura 21 – Potencial fungistático e fungicida de derivados e emulsões contra *Thielaviopsis ethacetica* (The). CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima; Tratamentos: Cin-

p: cinamaldeído puro; OEAA-p: óleo essencial puro de *Annona acutiflora*; E-Cin: emulsão de cinamaldeído 5.000 ppm; E-AaCin: emulsão de *Annona acutiflora* misturada com cinamaldeído 1:1 - 5.000 ppm.

7.1.6. EFEITO DAS EMULSÕES SOBRE O MICÉLIO DO FITOPATÓGENO

Paralelamente, o efeito das emulsões e do cinamaldeído no desenvolvimento micelial do fitopatógeno *T. ethacetica* foi determinado pela exposição de fragmentos de micélio (Fm) previamente cultivados por 7 d a 25 °C. As colônias de fungos nas placas de controle de crescimento em meio nutritivo MEA atingiram seu crescimento máximo após 48 h a 25 °C. A Figura 22a mostra o efeito visual dos tratamentos no crescimento de *T. ethacetica*. Nas placas de crescimento (branco), bem como nas placas expostas à emulsão combinada do óleo *A. acutiflora* e cinamaldeído (E-AaCin), foi observada a presença de micélio reprodutivo (Mr) devido à coloração acinzentada característica dos conídios secundários de *T. ethacetica*. Enquanto isso, na emulsão à base de cinamaldeído, a formação inicial de micélio vegetativo (Mv) pôde ser observada após 48 h de reinoculação de um micélio ativo. Nesse período, o cinamaldeído puro aplicado à superfície demonstrou impedir o desenvolvimento micelial do patógeno. As emulsões retardaram o crescimento do fungo por 48 h, com a emulsão combinada apresentando um índice médio de inibição abaixo de 50%. A partir de uma comparação múltipla não paramétrica pelo método de Dunn, foi possível identificar que há apenas diferença significativa entre a mediana do efeito da emulsão combinada e o cinamaldeído puro (Veja Quadro E3 do Apêndice E).

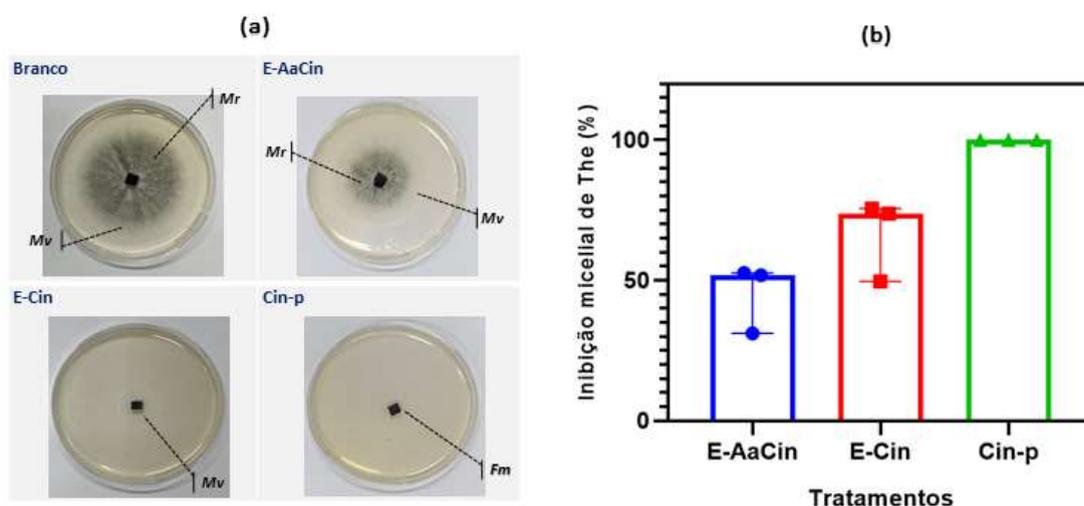


Figura 22 – Efeito das emulsões e o cinamaldeído sobre o desenvolvimento micelial de *T. ethacetica*. (a). Placas contendo fragmentos de micélio (fm) do fungo *T. ethacetica* exposto a diferentes tratamentos após 48 h de incubação, onde se distingue micélio vegetativo (Mv) e micélio reprodutivo

(Mr) (b). Porcentagens de inibição micelial da emulsão combinada do óleo *A. acutiflora* e cinamaldeído (E-AaCin), emulsão de cinamaldeído (E-Cin) e o cinamaldeído puro (Cin-p) a 5000 ppm.

7.1.7. EFEITO DAS EMULSÕES BIOATIVAS SOBRE A MICROBIOTA DE BANANAS

Foi avaliado o efeito antifúngico das emulsões sobre *T. ethacetica* em bananas, uma das frutas infectadas por esse patógeno no setor agroalimentar. Para isso, diferentes grupos de bananas desinfetadas e esterilizadas em UV por 15 min foram imersos nas emulsões preparadas e, após a secagem, foi realizada uma inoculação artificial com conídios de *T. ethacetica* e armazenados por 12 d a 25 °C. Com base na análise de variância, há diferenças significativas entre a população de unidades formadoras de colônias (UFC) dos diferentes grupos de bananas tratadas. As bananas tratadas com as emulsões brancas (Grupo 3) e o grupo de controle (Grupo 4) não apresentaram diferenças significativas em sua capacidade de afetar a população de conídios presentes nas bananas (Veja a Quadro F1 do Apêndice F). No entanto, o efeito da população de células fúngicas pelas emulsões E-AaCin e E-Cin nas bananas foi significativamente diferente ($p = 0,0029$ e $p = 0,0002$, respectivamente) em comparação com o grupo de controle. Particularmente, a emulsão E-Cin (Grupo 2) se destacou por ser capaz de reduzir 30% (3,505 Log UFC) da concentração de células identificada no grupo de bananas de controle (5,03 Log UFC).

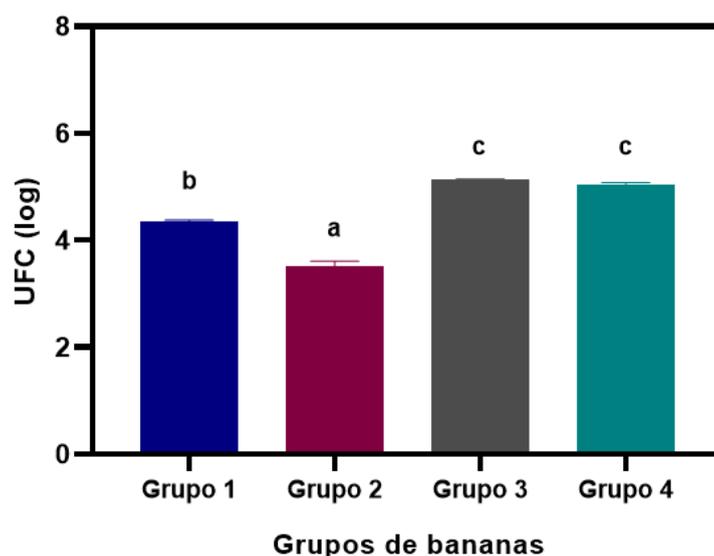


Figura 23 – Efeito das emulsões na contagem de unidades formadoras de colônias em bananas. Valores expressos em média com seu desvio padrão. A letra sobrescrita na mesma coluna (a–c) refere-se às diferenças significativas entre cada tratamento baseado nas análises de múltiplas comparações Dunnett's ($p < 0,05$). Grupo 1: Bananas tratadas com a emulsão combinada OE *A. acutiflora* (2500 ppm) e cinamaldeído (2500 ppm); Grupo 2: Bananas tratadas com a emulsão de

cinamaldeído (5000 ppm); Grupo 3: Bananas tratadas com o branco das emulsões; Grupo 4: Bananas tratadas com água estéril.

7.1.8. EFEITO DAS EMULSÕES EM BANANAS TRATADAS DURANTE ARMAZENAMENTO

7.1.8.1. Monitoramento da cor das bananas

A cor é um dos atributos que influencia fortemente a comercialização de frutas, por isso é essencial seu monitoramento quantitativo e instrumental quando elas são tratadas. Dessa forma, foi avaliado se as emulsões do óleo essencial de *A. acutiflora* e cinamaldeído, E-AaCin (Grupo 1), a emulsão do cinamaldeído, E-Cin (Grupo 2) e seu branco, B-Ne (Grupo 3) aplicadas por submersão em bananas influenciariam os diferentes parâmetros de cor de frutas independentes durante o armazenamento. A Figura 24 mostra o perfil de coloração das bananas experimentais para cada uma das coordenadas de coloração retangulares e cilíndricas com base no sistema CIELab. Diferenças significativas entre os diferentes tratamentos em relação ao grupo controle (Grupo 4) não foram identificadas nos parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* e $^{\circ}\text{Hue}$ baseado em comparações múltiplas após análise de variância, mas houve diferenças para o período de estocagem (Quadro G1, G2, e G3 do Apêndice G).

Entretanto, os parâmetros retangulares mostraram o início do amadurecimento a partir do dia 5. A tendência de diminuição da luminosidade (L^*) de todas as bananas após o quinto dia de armazenamento é mostrada na Figura 24a. A Figura 24b mostra a variação crescente da coordenada a^* do núcleo verde (valores de -5) para o vermelho (com valores de 5). Além disso, a partir do 5º dia, foi observada a redução da coordenada cromática de b^* dentro do campo de coloração amarela. Durante cada tempo de avaliação das bananas armazenadas a 25 °C, não foram observadas variações significativas na saturação da cor entre os diferentes grupos de bananas (Figura 24d, consulte o Quadro G4 do Apêndice G). Além disso, a tonalidade das bananas durante o período de armazenamento de 10 dias permaneceu amarelada com valores de $^{\circ}\text{Hue}$ acima de 70° (consulte a Tabela G5 do Apêndice G). Por fim, embora as bananas tratadas com a emulsão de cinamaldeído (E-cin) tenham apresentado graficamente a menor variação de cor entre o início e o fim dos experimentos, essas não foram significativamente diferentes em relação às bananas de controle (consulte o Quadro G6 do Apêndice G).

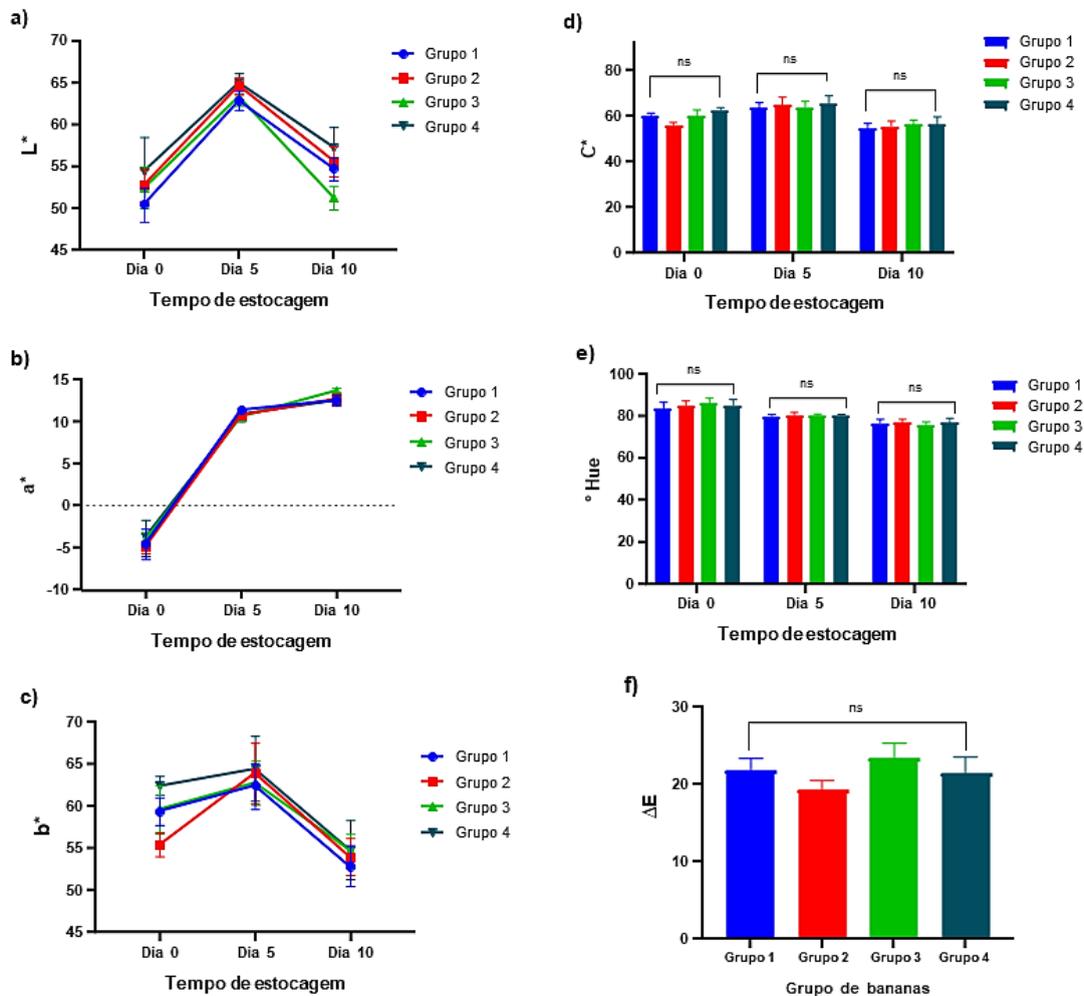


Figura 24 - Monitoramento das coordenadas e atributos de cor das bananas tratadas com emulsões durante armazenamento a 25 °C. Grupo 1: bananas tratadas com emulsão combinado E-AaCin (5000 ppm); Grupo 2: bananas tratadas com emulsão de cinamaldeído (E-cin, 5000 ppm); bananas tratadas com o branco da emulsão (contendo Tween 80); Grupo 4: bananas de controle tratadas com água destilada. Variações de luminosidade expresso em valores de L^* (a), coordenada cromáticas vermelho/verde a^* (b) e coordenada amarelo/azul b^* (c), saturação expresso em croma C^* (d), matiz expresso em $^\circ$ Hue (e); variação total de cor ΔE entre o dia inicial e final de avaliação. ns: representa que não há diferença significativa entre os tratamentos avaliados em cada período de avaliação. Os valores apresentados correspondem ao valor médio de cada avaliação com barras de erros representando o erro padrão da média (EPM).

7.1.8.2. Análises da textura das bananas

O efeito sobre a textura das bananas imersas em emulsões bioativas foi monitorado pelo teste de punção nos dias 0, 5 e 10 durante o armazenamento a 25 °C. Como a banana é uma fruta climatérica, seu amadurecimento ocorrerá durante o período de armazenamento após a colheita. Assim, a firmeza das bananas tende a diminuir durante o

armazenamento, conforme mostrado na Figura 25. Em contraste com os períodos de avaliação, não foram observadas diferenças significativas na força máxima de penetração entre as bananas tratadas em relação ao grupo de bananas de controle ($p < 0,05$) (Figura 25a, Quadro H1 do Apêndice H). Além disso, as porcentagens de redução da textura entre o primeiro e o último dia de avaliação permaneceram semelhantes para todos os grupos com valores médios entre 76% e 82% (Quadro H2 do Apêndice H), o que denota um processo de maturação homogêneo (Figura 25b). No entanto, conforme mostrado na Figura 25a, a partir do quinto dia, foi observada uma redução ligeira na textura dos diferentes grupos de bananas, o que poderia indicar o início do amadurecimento dos frutos. Essa hipótese também é apoiada pelo fato de que, embora a resistência média da banana nos grupos tenha continuado a diminuir entre o quinto e o décimo dia, esse diferencial foi muito menor.

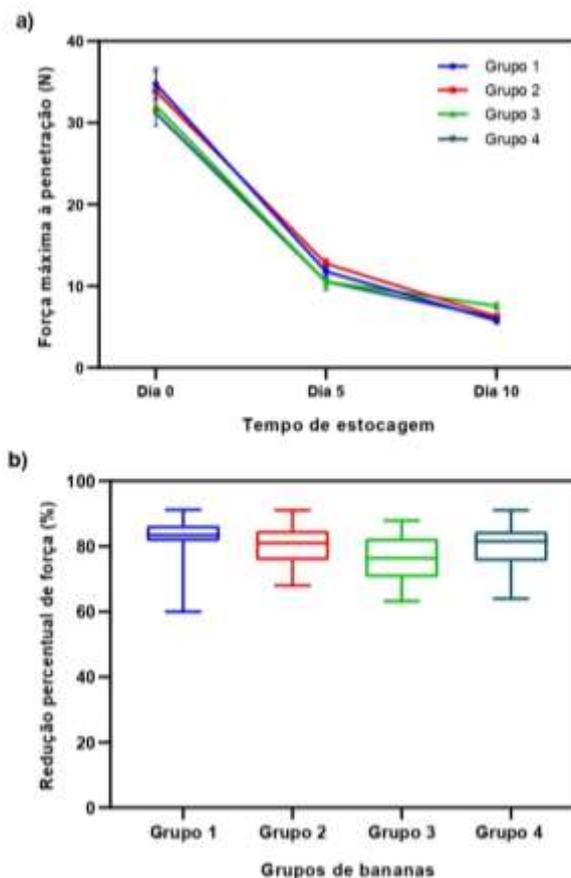


Figura 25 – Avaliações da textura pelo ensaio de punção de banana tratada com emulsões durante seu armazenamento a 25 °C. Grupo 1: bananas tratadas com emulsão combinado E-AaCin (5000 ppm); Grupo 2: bananas tratadas com emulsão de cinamaldeído (E-cin, 5000 ppm); bananas tratadas com o branco da emulsão (contendo Tween 80); Grupo 4: bananas de controle tratadas com água destilada.

7.1.8.3. Análises de sólidos solúveis totais em bananas

A análise dos sólidos solúveis totais é um dos critérios mais relevantes no estudo da qualidade pós-colheita das bananas. Foi avaliado o impacto das emulsões no conteúdo de SST das bananas durante o armazenamento. A partir da análise de variância, foi determinado que esse parâmetro físico-químico não apresentou diferenças significativas em cada um dos grupos de bananas para cada dia de avaliação (Figura 26; Quadro I1 do Apêndice I). No entanto, durante os primeiros 5 dias de armazenamento, foi observada uma tendência de aumento no teor de SST, atingindo valores médios altos de °Brix, variando de 25,15 a 25,66. Após o quinto dia, foi observada uma tendência de diminuição dos sólidos devido aos processos de maturação.

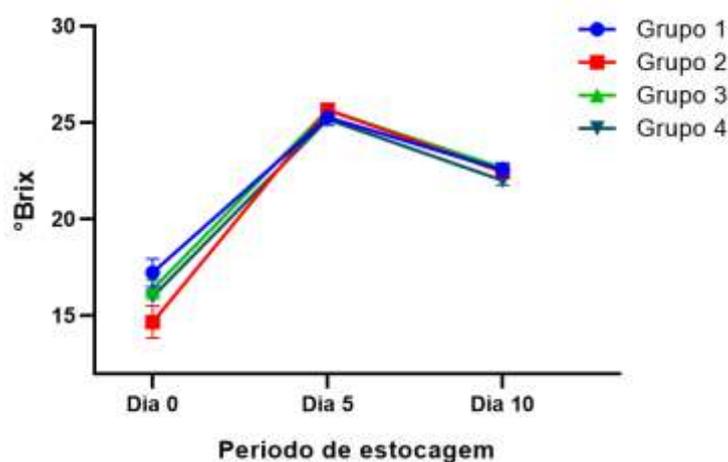


Figura 26 – Efeito do teor de sólidos solúveis totais nas polpas da banana tratada com emulsões durante o armazenamento a 25 °C durante 10 dias. Grupo 1: bananas tratadas com emulsão combinado E-AaCin (5000 ppm); Grupo 2: bananas tratadas com emulsão de cinamaldeído (E-cin, 5000 ppm); bananas tratadas com o branco da emulsão (contendo Tween 80); Grupo 4: bananas de controle tratadas com água destilada

7.1.8.4. Análise de pH em bananas durante armazenamento

O pH da polpa da fruta também foi avaliado durante os 10 d de armazenamento, com 3 d de avaliação periódica. A análise estatística revela que não há diferença no pH da polpa da banana durante as duas primeiras avaliações (Figura 27). Após, o quinto dia de avaliação observou-se uma leve tendência crescente nos valores do pH dos frutos em cada tratamento, particularmente do grupo de bananas tratadas com as emulsões. No 10º dia, observou-se que as bananas tratadas com as emulsões E-AaCin (Grupo 1) e E-cin (Grupo 2)

apresentaram diferenças significativas em comparação com o grupo de controle, de acordo com o teste de comparação múltipla de Dunnett ($p < 0,05$ - consulte a Tabela I1, Apêndice I).

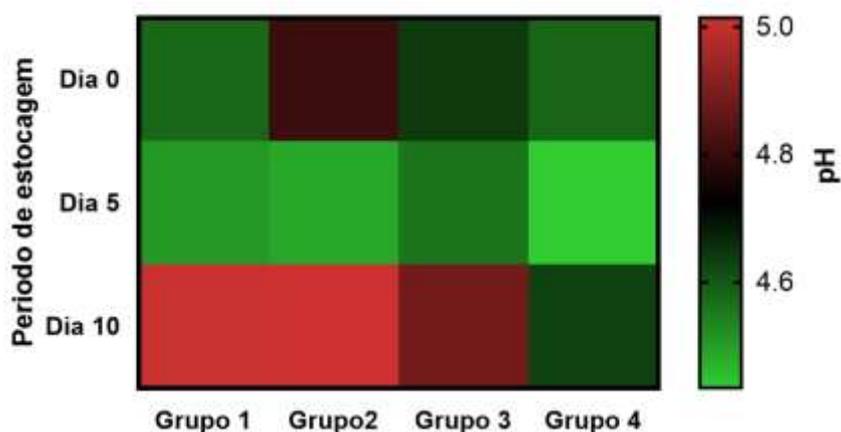


Figura 27 – Monitoramento do pH da polpa das bananas tratadas com emulsões. Grupo 1: bananas tratadas com emulsão combinado E-AaCin (5000 ppm); Grupo 2: bananas tratadas com emulsão de cinamaldeído (E-cin, 5000 ppm); Grupo 3: bananas tratadas com o branco da emulsão (contendo Tween 80); Grupo 4: bananas de controle tratadas com água destilada.

7.1.8.5. Análise da acidez titulável em polpa de bananas durante armazenamento

A Figura 28 ilustra as variações da acidez titulável da polpa de banana armazenada a 25 °C por 10 dias. Durante o período de armazenamento monitorado, observou-se que a contagem de acidez tendeu a diminuir a partir do 5º dia. Não foram identificadas diferenças significativas entre as porcentagens de ácido málico da polpa de banana de controle e da polpa de banana tratada com as emulsões ao final do período de monitoramento (consulte o Quadro 1K do Apêndice K).

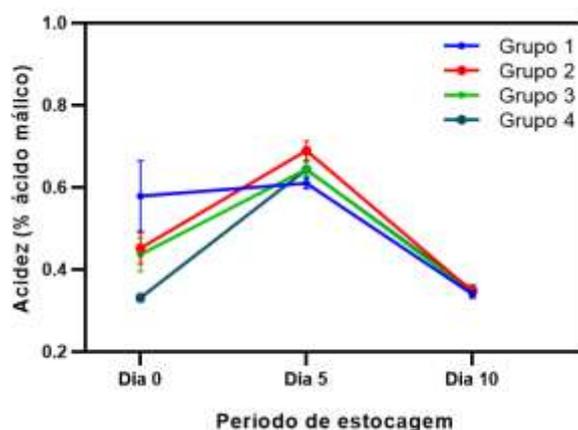


Figura 28 – Teores de acidez titulável da polpa das bananas durante o armazenamento a 25 °C. Grupo 1: bananas tratadas com emulsão combinado E-AaCin (5000 ppm); Grupo 2: bananas tratadas com emulsão de cinamaldeído (E-cin, 5000 ppm); Grupo 3: bananas tratadas com o branco da emulsão (contendo Tween 80); Grupo 4: bananas de controle tratadas com água destilada.

7.1.8.5. Identificação do índice de maturidade da polpa de banana

O índice de maturidade é diretamente proporcional ao teor de sólidos solúveis totais e inversamente à porcentagem de acidez total presente na polpa da banana. Assim, foi estudado se o efeito das emulsões afetava essa relação, que indica o grau de maturidade dos frutos. A Tabela 2 exibe que houve um aumento no índice de maturidade dos frutos durante o período de armazenamento da banana. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos no quinto e no décimo dia de avaliação, o que poderia indicar que as emulsões não influenciaram o índice de maturidade das bananas (Veja Quadro L1 do Apêndice L).

Tabela 2 – Variações do índice de maturidade de bananas

Grupos de bananas	Dia 0	Dia 5	Dia 10
Grupo 1	37,2 (21,2) ^b	41,6 (2,6) ^a	66,6 (4,7) ^a
Grupo 2	33,2 (4,3) ^c	37,6 (3,8) ^a	65,7 (7,7) ^a
Grupo 3	33,2 (4,8) ^a	37,6 (3,6) ^a	65,7 (7,3) ^a
Grupo 4	48,6 (4,1) ^a	40,3 (7,5) ^a	63,7 (6,9) ^a

Grupo 1: bananas tratadas com emulsão combinado E-AaCin (5000 ppm); Grupo 2: bananas tratadas com emulsão de cinamaldeído (E-cin, 5000 ppm); Grupo 3: bananas tratadas com o branco da emulsão (contendo Tween 80); Grupo 4: bananas de controle tratadas com água destilada. Valores médios e intervalos de LSD 95% de acordo com a análise de variância (ANOVA). A letra diferente sobrescrita na mesma coluna (a-b) refere-se às diferenças significativas baseado no teste de comparação múltiplas Dunnett's após análise de variância ($p < 0,05$) entre cada tratamento.

7.2. RESULTADOS DO ESTUDO 2

7.2.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus*

Mediante análise química, foram identificados 13 constituintes no óleo essencial das folhas de *C. citratus* (Quadro 9, Figura 1M do Apêndice M). Este derivado vegetal apresenta uma predominância de monoterpenos oxigenados (63,72%). Os monoterpenos oxigenados geranial e neral se destacam juntamente com o monoterpeno hidrocarboneto mirceno como os três principais compostos no óleo de *C. citratus* (31,8%, 24,7% e 29,7%, respectivamente).

Quadro 9 - Caracterização química do óleo essencial de folhas de *C. citratus* por CG-EM e GC-DIC

n	TR	IA _{exp}	IA _{lit}	Substância	Fórmula	Composição (%)
1	6,626	986	981	6-Metil-5-hepten-2-ona	C ₈ H ₁₄ O	1,28
2	6,727	990	988	Mirceno	C ₁₀ H ₁₆	29,74
3	7,182	1006	1002	δ-2-careno	C ₁₀ H ₁₆	0,06
4	7,795	1024	1020	p-cimeno	C ₁₀ H ₁₄	0,04
5	8,205	1036	1032	(Z)-B-ocimeno	C ₁₀ H ₁₆	0,57
6	8,577	1047	1044	(E)-B-ocimeno	C ₁₀ H ₁₆	0,41
7	10,455	1101	1095	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	1,09
8	12,377	1149	1154	Sabina cetona	C ₉ H ₁₄ O	0,33
9	12,972	1164	1160	(Z)-isocitral	C ₁₀ H ₁₆ O	1,26
10	13,723	1182	1177	(E)-isocitral	C ₁₀ H ₁₆ O	1,86
11	16,136	1241	1235	Neral	C ₁₀ H ₁₆ O	24,74
12	16,789	1256	1249	Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	2,91
13	17,394	1270	1264	Geranial	C ₁₀ H ₁₆ O	31,85
Classes químicas (%)						
Monoterpenos hidrocarbonetos						30,82
Monoterpenos oxigenados						63,72
Sesquiterpenos oxigenados						0,0
Sesquiterpenos hidrocarbonetos						0,0
Outros						1,62
Total identificado (%)						96,2

TR: tempo de retenção experimental; IA_{exp}: índice aritmético experimental; IA_{lit}: índice aritmético da literatura.

7.2.2. ESTUDO DE MICROENCAPSULAÇÃO

7.2.2.1. Distribuição de cargas dos biopolímeros

A hipótese principal deste estudo no desenvolvimento de micropartículas a partir de biopolímeros é que as interações eletrostáticas deles são a força dominante que impulsiona a complexação. Portanto, foi essencial estudar o potencial zeta dos biopolímeros para assim, selecionar cuidadosamente uma faixa do pH em que os polímeros tivessem cargas opostas para obter uma complexação bem-sucedida. A distribuição de carga dos biopolímeros pesquisados neste estudo é apresentada na Figura 29.

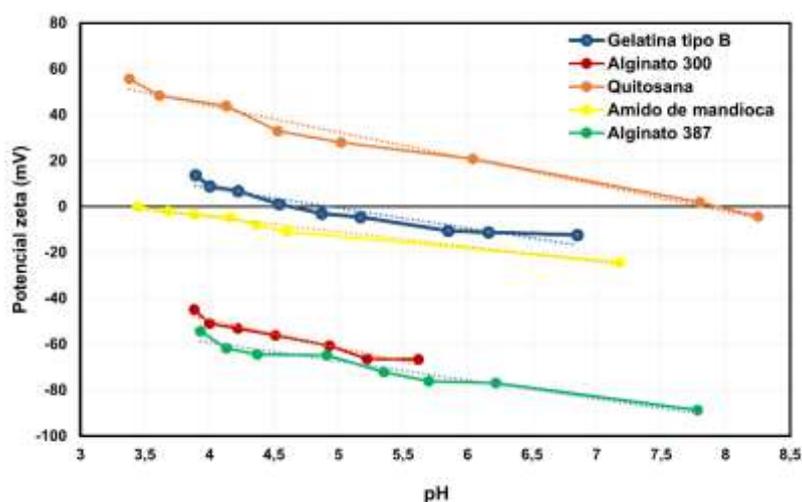


Figura 29 – Distribuição de cargas dos biopolímeros de estudo para o processo de microencapsulação. Todos os biopolímeros foram testados na concentração de 0,1%.

Os biopolímeros estudados apresentaram comportamentos distintos quanto à ionização de seus grupamentos com a mudança de pH. A quitosana mostrou-se carregada positivamente (45 mV em pH 4,0) e permaneceu positivamente carregada acima de um pH de 8, tendo como ponto isoelétrico um valor de 8,26. Entretanto, os dois tipos de alginato se mostraram carregados negativamente inclusive em um valor de pH ácido. O alginato 300 (ALG.300), por exemplo, apresentou valores de pH nativo de 5,62 com um potencial de -66,7 mV, enquanto o alginato mais viscoso, o alginato 387 (ALG.387), apresentou valores mais altos de carga (-88,6 mV) em seu pH nativo (7,78). As diferenças de carga foram observadas para os alginatos a um pH de 4,0, onde o ALG.387 apresentou uma carga média de -55 mV, enquanto o ALG.300 obteve um valor médio de 50,9 mV. Por outro lado, foi explorada a

densidade de carga do amido de mandioca, onde se pode determinar que a um pH de 4,0 apresenta um potencial zeta de -4,5 mV, sendo considerado um polieletrólito fraco ao contrário da quitosana ou do alginato. A gelatina tipo B tem um pH nativo de 6,85 a 41,5 °C. O ponto isoelétrico da gelatina está em torno de pH 4,9. Essa proteína em pH 4,0 apresentou uma densidade de carga média de 10,2 mV.

7.2.2.2. Testes experimentais de coacervação complexa

A partir do estudo do potencial zeta, estudos publicados e dados primários da equipe de pesquisa (dados não publicados) foram elaboradas diferentes formulações com variações de sólidos totais (STfx), proporções e biomateriais com foco dentro do pH 4.0 como é ilustrado no Quadro 10. Nestes ensaios foram verificadas a capacidade de complexação e encapsulação dos diferentes pares poliméricos usando inicialmente como núcleo o óleo resina de páprica em óleo de girassol (1,25%). Em primeiro lugar, foram obtidas micropartículas por coacervação complexa a partir do par polimérico amplamente estudado na literatura (gelatina tipo B - goma arábica, 1:1; pHc: 4,0; HCl; Ver Quadro 10 – F1), a fim de padronizar algumas características da técnica, como velocidades de agitação, velocidade de gotejamento do ácido, tempo de resfriamento, entre outros fatores. Posteriormente, o par alginato-quitosana foi a formulação desenvolvida no presente estudo devido à ausência de estudos de microencapsulação com ambos os polissacarídeos para aplicação em frutas. Porém, no momento da realização dos testes a um pH de coacervação (pHc) de 4,0, foi observado aumento de viscosidade e formação de estruturas filamentosas durante a interação entre quitosana e alginato em diferentes temperaturas e velocidades de mistura, o que levou a procurar de novas formulações (F2).

Assim, a formulação amido de mandioca - alginato 387 (AM – ALG.387) foi testada, mas nenhuma separação de fase foi obtida (F3). Então foi feita uma tentativa de alterar a fase emulsificante promovendo a sedimentação das partículas, mas quando visualizados no microscópio, foram observados agregados indefinidos com gotículas de óleo incorporadas e livres (F4). Além disso, o par quitosana-amido de mandioca (QUI-AM) não apresentou os resultados esperados, pois houve precipitação dos sólidos sem encapsulamento do núcleo dentro das partículas. Assim, a coacervação da proteína de ervilha e do alginato mais viscoso (PEA-ALG.387; F5) foi explorada usando HCl para ajustar o pH do sistema, mas como não foi

observada decantação da fase polimérica e dispersão total do óleo (Ver F6 – Quadro 10), decidiu-se alterar a ordem de entrada dos polímeros ao sistema e do ácido usado. Usando a mesma proporção polimérica (ALG.387-PEA 1:3), mas com a adição de um ácido mais fraco, como o ácido acético glacial, foi possível observar a separação de fases e o encapsulamento do óleo. Ao observar no microscópio, foi percebido que grandes conglomerados foram formados com uma morfologia não circular, atípica de uma micropartícula por coacervação complexa (F7).

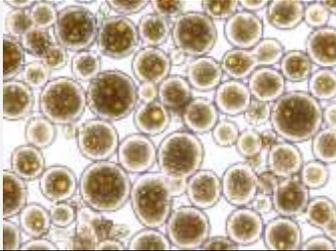
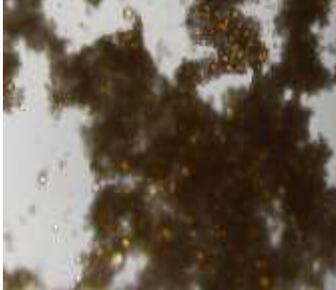
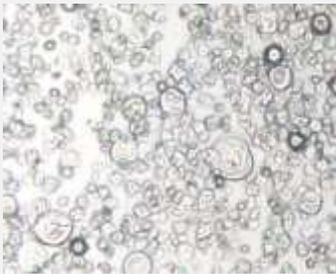
Devido aos resultados pouco promissores e às limitações para estudar a distribuição de carga de novos biopolímeros, decidiu-se aplicar a formulação descrita no estudo de Devi e Kakata (2013), que usaram gelatina tipo A e alginato em uma proporção de 3,5:1 com um ajuste de dois ácidos para um pH de coacervação (pHc) de 3,75. Porém, o presente estudo confirmou que o sistema nessa proporção e pHc abaixo de 4 usando ácido clorídrico não permitiu a separação a fase aquosa da polimérica (F8), ao contrário do sistema usando ácido acético glacial (F9), que formou partículas em forma de bastonete com diâmetros acima de 500 µm em um meio bastante viscoso. Ao propor uma proporção de acordo com a carga diferencial de gelatina tipo A e alginato.387 (3,2:1) em um pH de 4,0 com HCl, a coacervação não foi alcançada, sendo que o óleo formou uma camada superior no sistema. Enquanto isso, ao adicionar ácido acético para ajuste do pH a 4,25, a separação de fases foi observada e a incorporação de gotículas de óleo foi visualizada no microscópio. No entanto, o tamanho da partícula gerada não era circular e com tamanho superior a 200 µm, portanto essa formulação foi descartada (F12).

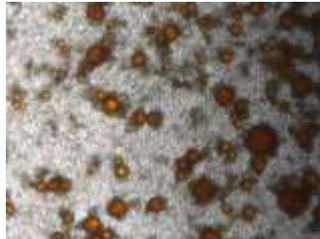
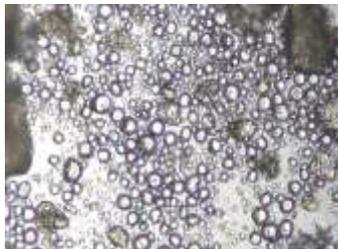
Ao perceber que as partículas com gelatina tipo A (Gea) e o alginato.387 (ALG.387) não apresentavam uma forma circular definida e homogênea, foi proposto explorar a interação entre a gelatina tipo B (GEb) e um alginato menos viscoso (ALG.300) para a formulação de micropartículas. Ao experimentar o sistema GEb-ALG.300 na proporção 4,5:1 para valores de pH de coacervação acima de 4 com a adição de gotas de ácido acético, foram formadas partículas contendo gotículas de óleo que apresentavam uma morfologia mais definida em forma de bastonete e ovoide, mas com dimensão variável e não necessária para a finalidade desejada (Quadro 10 - F13 e F15). Ao alterar o núcleo das partículas de óleo de resina de páprica para o óleo essencial de *C. citratus* (OECc) a 0,1% para o sistema GEb-ALG.300 4,5:1 para uma neutralização de carga a 4,15 com ácido acético glacial -CH₃COOH, partículas mais definidas puderam ser observadas com um tamanho inferior a 200 µm,

contendo gotículas que poderiam ser de óleo essencial dentro delas (F15). Entretanto, essa formulação apresenta como limitações uma redução na massa de coacervado decantada, bem como uma perda considerável de óleo. Para superar a perda de óleo, foi proposta a realização de experimentos com a adição de 10 μL de Tween 80 ao óleo essencial a ser misturado com a proteína, mas os resultados não foram tão promissores (veja a Figura 30c).

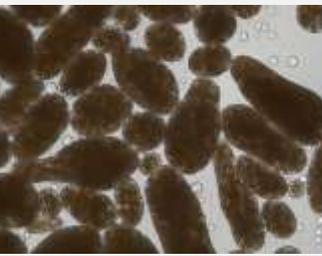
Além disso, o fato de a coacervação nesse sistema ter ocorrido em um pH de 4,25 e 4,15 com tamanho de partículas menores em relação as partículas formadas no pH de 4,0 (Figura 3) indicou que o sistema não está completamente ajustado. Portanto, foi necessário um novo estudo de distribuição de carga dos biopolímeros GEb e ALG.300. Esse estudo nos permitiu definir uma nova proporção dos polímeros com base nas cargas diferenciais de ambos os polímeros (Figura 29). onde, em um pH de 4,0, permitiria sua coacervação e o encapsulamento do óleo com partículas menores a 200 μm . Além disso, foi avaliado se a adição de ácido clorídrico (HCl) ao sistema estabilizado poderia afetar o tamanho médio das partículas (Figura 30b). Entretanto, a redução da perda de óleo essencial dentro do sistema persistiu como a limitação dessa formulação polimérica.

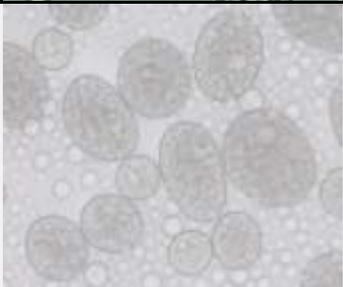
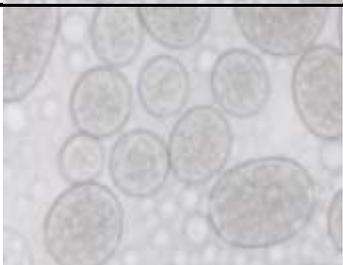
Quadro 10 – Experimentos para a seleção do sistema ideal de coacervação complexa

ID	Fase emulsificante	Fase complexante	Razão	pHc	Ácido	Separação de fases	Encapsulação do óleo	Tamanho de partícula < 200 μm	Microscopia
F1 ^a	GEb	GA	1:1	4,0	HCl	Positivo	Positivo	Positivo	
F2 ^a	QUI	ALG.387	1:1,5	4,0	HCl	Negativo	Negativo	Negativo	
F3 ^a	AM	ALG.387	10:1	4,0	HCl	Negativo	Negativo	Não aplica	
ID	Fase emulsificante	Fase complexante	Razão	pHc	Ácido	Separação de fases	Encapsulação do óleo	Tamanho de partícula < 200 μm	Microscopia

F4 ^a	ALG.387	AM	1:10	4,0	HCl	Positivo	Negativo	Não aplica	
F5 ^a	QUI	AM	1:9	4,0	HCl	Negativo	Negativo	Não aplica	
F6 ^a	PEA	ALG.387	3:1	4,0	HCl	Negativo	Negativo	Não aplica	
ID	Fase emulsificante	Fase complexante	Razão	pHc	Ácido	Separação de fases	Encapsulação do óleo	Tamanho de partícula < 200 μm	Microscopia

F7 ^a	ALG.387	PEA	1:3	4,0	CH ₃ COOH	Positivo	Positivo	Negativo	
F8 ^a	GEa	ALG.387	3,5:1	3,7	HCl	Negativo	Negativo	Não aplica	Não aplica
F9 ^a	GEa	ALG.387	3,5:1	3,7	CH ₃ COOH	Positivo	Positivo	Negativo	
F10 ^a	GEa	ALG.387	3,5:1	4,25	CH ₃ COOH	Positivo	Positivo	Negativo	
ID	Fase emulsificante	Fase complexante	Razão	pHc	Ácido	Separação de fases	Encapsulação do óleo	Tamanho de partícula < 200 μm	Microscopia
F11 ^a	GEa	ALG.378	3,2:1	4,0	HCl	Negativo	Negativo	Não aplica	Não aplica

F12 ^a	GEa	ALG.378	3,2:1	4,25	CH ₃ COOH	Positivo	Positivo	Negativo	
F13 ^a	GEb	ALG.300	4,5:1	4,25	CH ₃ COOH	Positivo	Positivo	Negativo	
F14 ^a	GEb	ALG.300	4,5:1	4,15	CH ₃ COOH	Positivo	Positivo	Negativo	
ID	Fase emulsificante	Fase complexante	Razão	pHc	Ácido	Separação de fases	Encapsulação do óleo	Tamanho de partícula < 200 μm	Microscopia

F15 ^b	GEb	ALG.300	4,5:1	4,15	CH ₃ COOH	Positivo	Positivo	Positivo	
F16 ^c	GEb	ALG.300	4,5:1	4,15	CH ₃ COOH	Positivo	Positivo	Positivo	
F17 ^c	GEb	ALG.300	5:1	4,0	CH ₃ COOH	Positivo	Positivo	Positivo	

Materiais de parede: GEb: gelatina tipo B, Gea: gelatina tipo A; PEA: proteína de ervilha, QUI: quitosana, ALG.300: alginato.300, ALG.387: alginato.387, GA: goma arábica; Tipos de núcleos: ^a Estas formulações foram preparadas usando oloresina de páprica em óleo de girassol como núcleo devido a limitada quantidade de óleo essencial; ^b Esta formulação foi realizada com o óleo *C. citratus* a 0,1% como núcleo e a micrografia das partículas foi observada na objetiva 40x. ^c O núcleo ou princípio ativo nestas partículas foi o óleo essencial *C. citratus* a 2,5% e as partículas foram observadas na objetiva de 10x. pH: pH de coacervação; HCl: ácido clorídrico; CH₃COOH: ácido acético glacial.

7.2.2.3. Avaliação da estequiometria do par polimérico ideal

Uma vez identificada a proporção adequada do par polimérico gelatina tipo B e alginato 300 (GEb-ALG.300) para a formação de coacervados, a intensidade da interação entre os biopolímeros foi avaliada por meio de variações de turbidez quando os sistemas foram analisados em três pHs diferentes. O teste pressupõe que, no pH ideal de coacervação, ocorreria uma rápida separação de fases, causando um aumento da turbidez no meio devido à maior interação entre os polímeros. A Figura 30 apresenta o comportamento do par de polímeros escolhido para coacervação em duas proporções, em relação ao pH. Como visto na Figura 30, a proporção 4,5:1 do par GEb-ALG.300 apresentou o pH ideal para coacervação em 4,15, apesar de ter sido projetada para um pH de 4, o que indicaria o desequilíbrio no sistema. Enquanto isso, na proporção ideal (GEb:ALG.300 5:1), observa-se que a interação entre os polímeros nos valores de pH de 4,0, 4,15 e 4,25 foi maior que a proporção inicial, com uma faixa de intensidade de turbidez mais curta, mas verifica-se que, em um pH de 4,0, ocorre a maior interação percebida devido ao seu maior valor médio de turbidez.

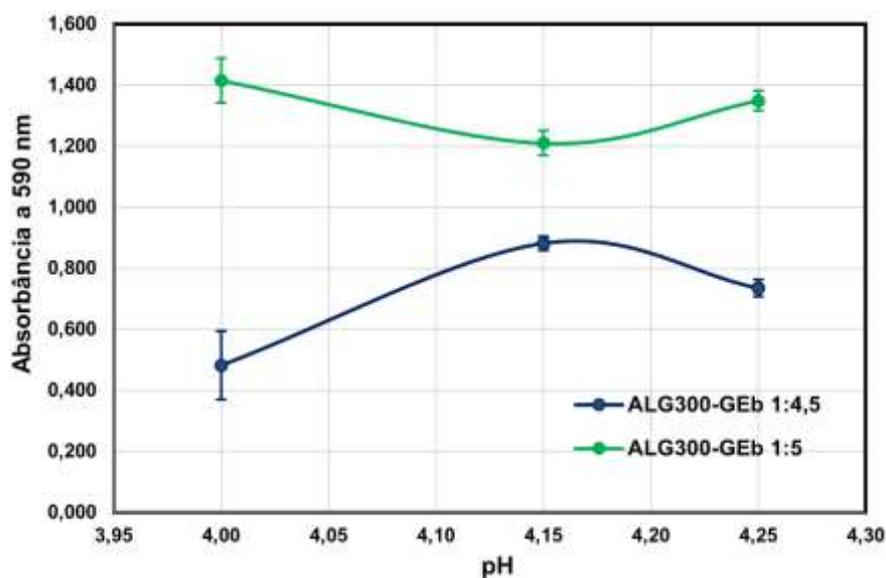


Figura 30 – Turbidez do par polimérico alginato 300 e gelatina tipo B (ALG.300-GEb) nas proporções de 1:4,5 e 1:5 em função de alternância do pH. O total de sólidos dos biopolímeros foi de 1% (m/m).

7.2.2.4. Caracterização do processo de coacervação

Três sistemas de coacervação foram caracterizados de acordo com o teor de umidade, o rendimento da coacervação e o rendimento da complexação, conforme apresentado na Tabela 3. As partículas coacervadas do sistema GEb:ALG.300 4,5:1 encapsulando 2,5% do óleo essencial de *C. citratus* (OECc) (que foram usadas no teste de microdiluição) apresentaram maior teor de umidade em comparação com os outros sistemas estáveis. No entanto, seu rendimento de coacervação foi inferior a 30%, enquanto sua complexação foi superior a 40%. Por outro lado, a massa de partículas coacervadas úmidas dos sistemas GEb:ALG.300 5:1 com 0,50 e 0,25% de fase oleosa apresentou sólidos acima de 11%. O sistema GEb:ALG.300 na proporção 5:1 com 1,8% de sólidos totais fixos (p.0,50%) apresentou um desempenho de coacervação mais alto em comparação com o sistema GEb:ALG.300 5:1 com 2,0% encapsulando 0,25% de óleo essencial. No entanto, o desempenho da complexação do polímero de ambos os sistemas na mesma proporção foi bastante baixo, com valores abaixo de 25%, e a formulação encontrada requer mais refinamento.

Tabela 3 – Caracterização da formação de partículas coacervadas

Sistema	Teor de ST (%)	Umidade (%)	Rend. coacerv. (%)	Load úmido	Rend. complex (%)
p.2,50%	7,10	92,90	27,42	0,0617	40,24
p.0,50%	12,78	87,22	62,67	0,0256	20,04
p.0,25%	11,27	88,73	52,40	0,0130	19,74

p.2,50% corresponde ao sistema microencapsulado de ALG.300-GEb (1:4,5) encapsulando o óleo essencial de *C. citratus* OECc a 2,5% (m/m), com sólidos totais fixos (STfx) de 2,0% a um pHc de 4,15 ajustado com CH₃COOH; p.0,50%: ALG.300-GEb (1:5); OECc a 0,50% (m/m); STfx: 1,80%; pHc: 4,15 - CH₃COOH; ; p.0,25%: ALG.300-GEb (1:5); OECc a 0,25% (m/m); STfx: 2,0%; pHc: 4,0 - CH₃COOH . M.coacerv.: massa do coacervado; ST: sólidos totais; Rend. coacerv (%): percentagem do rendimento de coacervação; Rend. complex (%): percentagem do rendimento de complexação.

7.2.2.5. Caracterização do tamanho médio das micropartículas

O tamanho médio e a largura da distribuição das partículas úmidas geradas nos experimentos de coacervação foram analisados por meio da técnica de dispersão de luz a laser. A Figura 31 ilustra a distribuição dos diâmetros médios de volume das micropartículas nos sistemas GEa-ALG.387 e GEb-ALG.300. A coacervação com o sistema polimérico de

gelatina tipo A com alginato 387 resultou em partículas com um tamanho médio de 551,44 μm e uma amplitude média de 0,298 (Figura 31a), portanto, foi prudente desconsiderar essa formulação e procurar outras. O novo par polimérico, alginato 300 e gelatina tipo B na proporção 1:4,5 (proporção determinada a partir do potencial zeta dos biopolímeros em estudos secundários) e ajustando o sistema a um pH de 4,15 e adicionando 0,1% do óleo *C. citratus* (OECc) geraram um tipo de partículas com diâmetro menor (188,74 μm), ao contrário do sistema que, nas mesmas condições, onde foi adicionado o 2,5% de óleo OECC (269,991 μm). No entanto, o sistema com a maior concentração de óleo exibiu uma redução menor na largura da distribuição do diâmetro com um valor de amplitude de 2,425, enquanto o sistema com a menor concentração de óleo exibiu uma amplitude de distribuição maior de 4,156, conforme visualizado na Figura 31b. A coacervação com esse mesmo sistema em um pH de 4,0 e 2,5% de fase oleosa também não permitiu a obtenção de partículas com diâmetro médio inferior a 200 μm e distribuição inferior a 2,00. Nesse mesmo sistema com uma fase oleosa de 0,25% de óleo OECc em pH 4,15, pode-se observar que, embora o tamanho da partícula tenha sido reduzido (de 230,01 μm para 197,118 μm) com a adição de Tween 80, ele não melhora o índice de polidispersividade do sistema e não ajuda a superar completamente o processo de encapsulamento do óleo para evitar sua perda (Figura 31c).

Com a proporção ideal de polímeros alginato e gelatina tipo B (1:5) em um pH de 4,0, pode-se observar que o HCl, além de prejudicar o processo de coacervação usando alginatos moderadamente viscosos, causa a produção de coacervados com diâmetro e índice de polidispersividade maiores ($D_{4,3}$ de 318,36 μm ; span de 1,798) em comparação com o uso de ácido acético ($D_{4,3}$ de 103,7 μm ; span de 0,864) (Figura 31d). Por fim, com o ajuste adequado da proporção de biopolímeros, do pH e do ajuste do ácido, foi possível produzir partículas contendo o OECc com diâmetros $D_{4,3}$ abaixo de 100 μm . As partículas contendo 0,5% de OECc em 1,8% de biopolímeros apresentaram o menor diâmetro médio e a distribuição dessas partículas com valores de 85,47 μm e amplitude de 0,922. Enquanto isso, o sistema que encapsulou 0,25% de óleo promissor em 2,0% de polímeros produziu um conglomerado de partículas de 99,73 μm e uma distribuição de tamanho de 1,24, um valor muito menor do que o determinado nas partículas dos sistemas anteriores (Figura 31e).

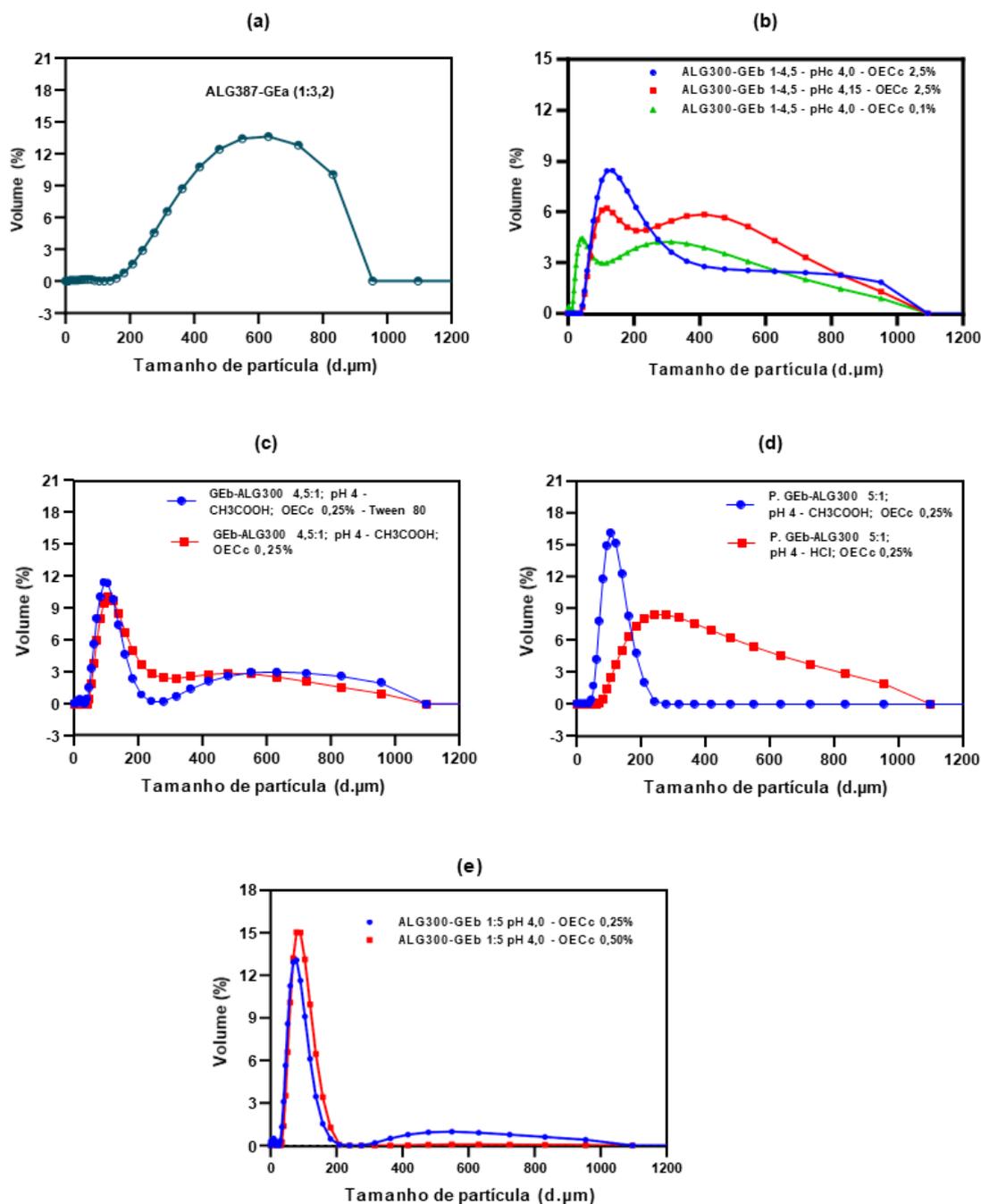


Figura 31 – Distribuição do diâmetro de volume médio das micropartículas analisadas por espalhamento de luz de laser. As curvas plotadas expressam a curva média do diâmetro de volume das partículas com 6 repetições.

7.2.2.6. Morfologia de coacervados gerados

A morfologia das partículas geradas durante a coacervação complexa encapsulando o óleo essencial foi observada em microscopia óptica com o auxílio de contraste de fase (Figura 32). As partículas geradas pelo sistema ALG.300:GEb 1:4,5 encapsulando 2,5% do OECc apresentam morfologias que variam de bastões pontiagudos a formas circulares com

tamanhos e coloração variados. Essas partículas de cor cinza a marrom apresentavam gotículas de óleo essencial multinucleadas, o que lhes deu uma aparência áspera. Em contraste com esse sistema, a formulação ideal de ALG.300:GEb na proporção 1:5 apresentou partículas com formas mais circulares e ovóides com uma coloração mais clara, onde aparentemente é possível visualizar o aprisionamento das gotículas. Entretanto, é necessário comprovar a encapsulação do óleo por métodos químicos.

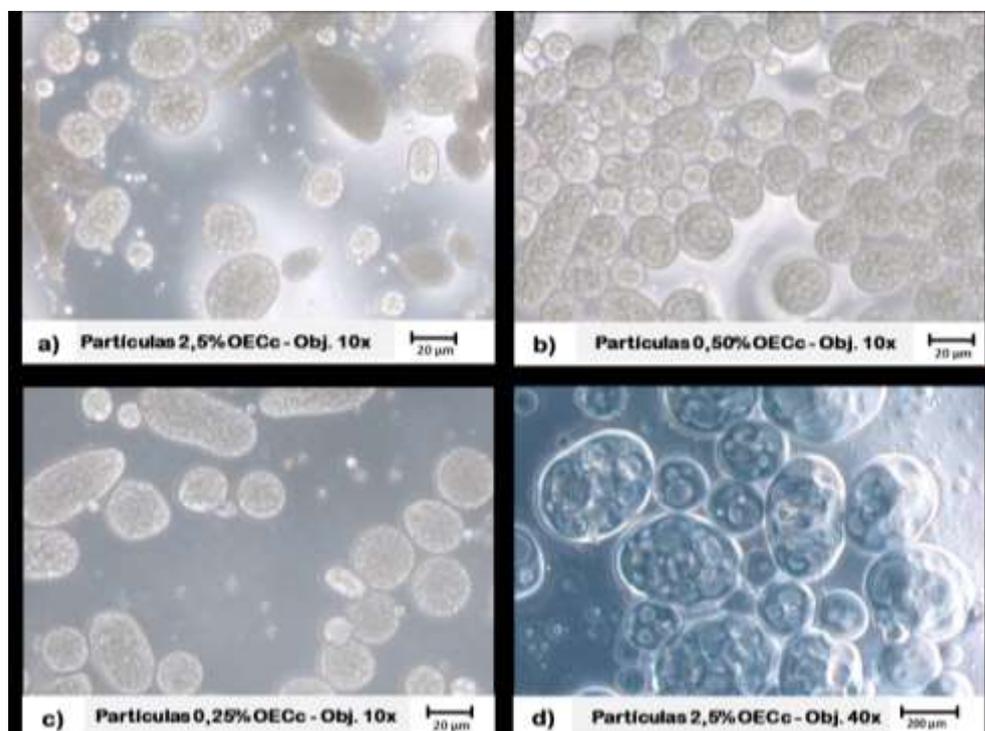


Figura 32 – Micrográficos das partículas geradas por coacervação complexa encapsulando o óleo essencial *C. citratus* por fase de contraste em microscópio ótico.

7.2.2.7. Verificação da presença de óleo encapsulado

A verificação de que o óleo essencial estava encapsulado dentro das micropartículas formuladas foi realizada por meio de métodos espectrofotométricos e de cromatografia gasosa, utilizando o padrão de óleo. Conforme relatado pela análise de CG-EM/DIC, o principal componente do óleo OECc é o citral (geranial e neral), portanto, isso foi usado para avaliar se esses compostos estavam presentes nas partículas. A partir da análise espectrofotométrica, foi observada uma elevação da curva de OECc em 333 nm paralela às amostras extraídas em cloreto de metileno. Enquanto isso, o padrão citral apresentou seu maior pico em uma compressão mais alta (343 nm), mas com o mesmo perfil de curva das

alíquotas (Figura 33a). Por outro lado, na análise cromatográfica do padrão, um primeiro pico pode ser observado entre o tempo de retenção de 16,2 e 16,5 min e um segundo pico maior entre 17,5 e 18 min, que poderiam ser neral e geranial, respectivamente. Na curva da amostra 1, observa-se com maior intensidade que estas apresentam o mesmo perfil de citral, razão pela qual se pode afirmar a presença do óleo essencial no interior das micropartículas geradas (Figura 33b).

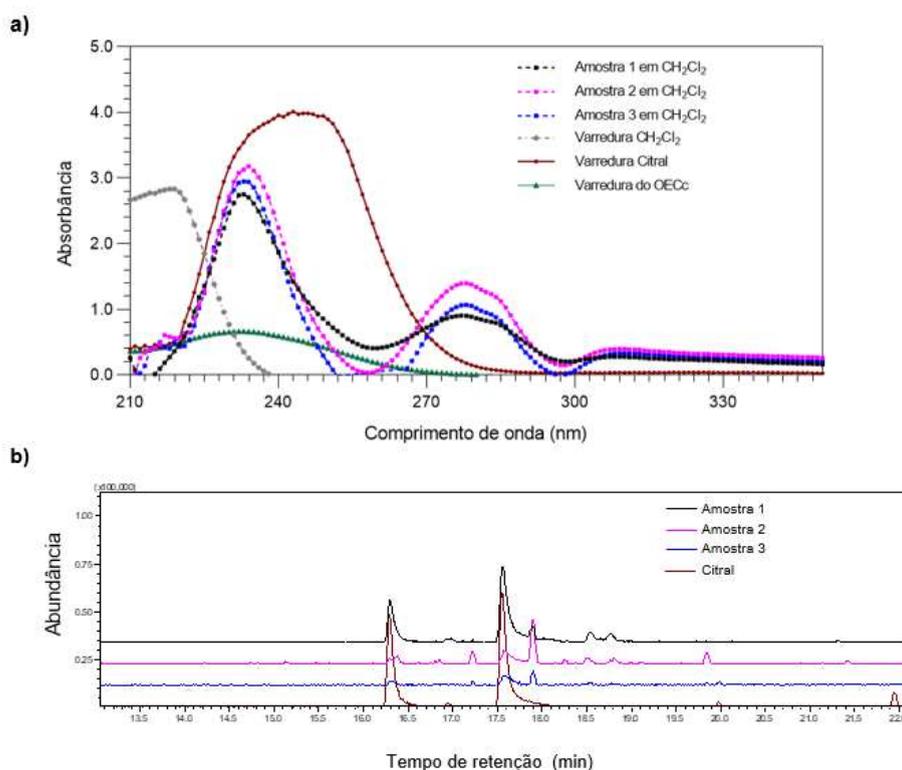


Figura 33 – Perfil por espectrofotometria e cromatografia do conteúdo de partículas em comparação com o padrão citral. a) curvas de varredura das extrações do derivado vegetal em micropartículas por espectrofotometria; b) cromatograma em CG das alíquotas extraídas em comparação com o citral. Amostra 1, 2 e 3 são réplicas das extrações em diclorometano (CH₂Cl₂) das micropartículas GEB-ALG.300 contendo 0,25% de óleo essencial OECC; citral: padrão contendo (geranial e neral); OECC: óleo essencial de *C. citratus*.

7.2.3. ATIVIDADE FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA *IN VITRO* DO ÓLEO DE *C. CITRATUS* LIVRE E ENCAPSULADO

A atividade fungistática e fungicida do óleo essencial de *C. citratus* (OECC) livre e encapsulado nas partículas contra o fungo *Alternaria alternata* foi determinada pelo método de microdiluição padrão do CLSI (2008). A partir da variação de cor do meio em micropoços

e sem observar crescimento visível, foi determinado que a concentração fungistática do óleo OECc foi reduzida em 4 vezes quando foi exposto a conídios do patógeno na forma encapsulada nas partículas em comparação com a forma livre no meio nutriente (Tabela 4). Da mesma forma, o encapsulamento do óleo essencial promissor mostrou uma melhoria na capacidade total de afetar os conídios do agente etiológico da pinta preta do tomate, *A. alternata*. A partir do resultado da inibição fúngica em placas contendo meio nutritivo solidificado após 48 h de inoculação, pode-se verificar que o derivado essencial encapsulado foi capaz de exercer atividade fungicida sobre *A. alternata* com concentrações mais baixas em comparação quando este foi aplicado livremente na microplaca (CFM: 0,50%).

Tabela 4 – Concentrações fungistática e fungicidas do óleo essencial *C. citratus* em forma livre e encapsulada contra o fungo *A. alternata*

Tratamento	CIM	CFM
OECc livre	0,125%	0,500%
OECc encapsulado*	0,03125%	0,0625%

OECc: óleo essencial de *Cymbopogon citratus*; CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima; * Partículas do sistema ALG.300- GEb 1:5 contendo 2,5% do OECc.

7.2.4. CARACTERIZAÇÃO DOS REVESTIMENTOS

As partículas formuladas contendo 0%, 0,5% e 0,25% do óleo essencial de *C. citratus* (OECc), juntamente com o óleo livre (0,25%), foram adicionadas para a formulação de revestimentos bioativos a base de fécula de mandioca (EFF4, EFF1, EFF2 e EFF3 respectivamente). Essas emulsões formadoras de filme foram caracterizadas em termos de densidade, viscosidade, pH e tamanho e distribuição de partícula (Tabela 5). A introdução de óleo essencial encapsulado e livre levou a uma redução na densidade (ρ) das dispersões formadoras de filme (EFF). Da mesma forma, as EFFs eram ácidas e mostraram que aquelas que continham o óleo essencial tinham pH mais baixo em comparação com a dispersão em que apenas partículas sem óleo foram carregadas. Os valores de viscosidade aparente (η_{ap}) em uma taxa de cisalhamento de 100 s^{-1} diminuíram significativamente ($p < 0,05$) em função da concentração do óleo essencial incorporado. Os diferentes EFFs apresentaram diferenças significativas em seu tamanho médio de partícula com uma faixa $D_{4,3}$ de 34,02 a 35,77 μm e uma distribuição monomodal.

Tabela 5 - Propriedades físico-químicas das emulsões formadores de filmes

Revestimento	ρ (kg/m ³)	pH	η_{ap} (100 s ⁻¹) (Pa·s)	D _{4,3} (μm)
EFF1	1016,41 (0,13) ^b	4,32 (0,086) ^b	0,1365 (0,0001) ^b	35,77 (0,0110) ^c
EFF2	1016,56 (0,13) ^b	4,16 (0,006) ^c	0,1015 (0,0036) ^c	34,96 (0,0114) ^d
EFF3	1015,10 (0,25) ^b	4,32 (0,010) ^b	0,0778 (0,0045) ^c	34,02 (0,0152) ^b
EFF4	1019,22 (0,12) ^a	4,71 (0,052) ^a	0,1627 (0,0029) ^a	34,33 (0,0279) ^a

A letra em sobrescrito na mesma coluna (a - d) refere-se a diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo de controle de acordo ao pós-teste de comparações múltiplas Dunnett ($p < 0,05$). EFF1: revestimento contendo micropartículas com óleo essencial de *C. citratus* (OECc) a 0,50%; EFF2: Revestimento contendo micropartículas encapsulando OECc a 0,25%; EFF3: revestimentos contendo livre o OECc a 0,25%; EFF4: revestimento contendo partículas sem óleo (controle negativo).

Adicionalmente, a eficiência qualitativa de recobrir os frutos com os revestimentos preparados a base de fécula de mandioca foi avaliada sobre tomates usando uma solução de iodo. Inicialmente, a formulação descrita no Apêndice B foi testada, mas esta não apresentou os resultados esperados (Figura 33a). Devido à baixa adesão da primeira formulação descrita, decidiu-se modificar a formulação de revestimentos como é descrito na Seção 6.2.4.2., e avaliou-se o tempo e o número de vezes que seriam necessários para revestir mais de 90% de um tomate. De acordo com a Figura 34, submergir duas vezes por 2 min cada tomate permitiu que a maior parte da superfície do fruto fosse revestida em comparação com o não revestido (T5), de modo que esse foi o método aplicado para revestir os tomates usados no teste antifúngico *in situ*, como o ensaio de vida de prateleira do fruto (Figura 34b).



Figura 34 – Imagens da avaliação qualitativa da efetividade do recobrimento com revestimentos a base de fécula de mandioca usando iodo. a) tomates revestidos com a formulação inicial descritos no Apêndice B. Tomates com manchas pretas na superfície indica a presença de amido na superfície do fruto. b) tomate revestido com a formulação adequada descrita na seção 6.2.4.1. c) T1: tomate revestido 3 vezes durante 2 min; T2: tomate revestido 1 vez por 5 min; T3: tomate revestido 2 vezes por 2 min cada vez; T4: tomate revestido 1 vez por 2 min; T5: tomate não revestido.

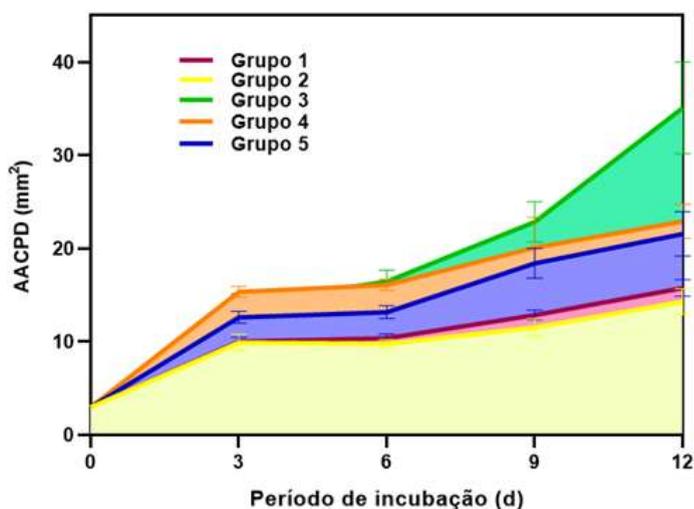
7.2.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO CURATIVO DOS REVESTIMENTOS BIOATIVOS SOBRE TOMATES

O efeito de revestimentos contendo micropartículas do óleo essencial de *C. citratus* sobre o fungo *A. alternata* simulando a doença da pinta preta em tomates como uma condição de contaminação extrema foi avaliado. Para isso, os tomates revestidos após 3 h de secagem foram feridos assepticamente e, posteriormente, contaminados artificialmente com 10 μL de uma suspensão de conídios de *A. alternata* a 1×10^6 conídios mL^{-1} . O efeito foi monitorado em todos os grupos de tomates revestidos durante 12 d de incubação do fungo com as mesmas condições de temperatura e umidade (25°C). A partir das medidas de diâmetro dos tomates nos diferentes grupos, foi determinada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), que mostrou o progresso da doença nos tomates (Figura 35). Os grupos de tomates revestidos com EFF contendo o óleo OECc foram afetados pela ação patogênica de *A. alternata* em diferentes proporções. Os grupos de tomates revestidos com óleo essencial OECc encapsulado (Grupo 1 e Grupo 2) apresentaram os menores valores de AACPD (128 e 119,7 mm^2 em relação ao grupo não revestido (Grupo 5). O grupo de tomates

tratados com revestimento contendo óleo livre (Grupo 3) foi o mais acometido pela doença com AACPD de 217,6 mm² com intervalo de confiança de 95% de 167,2 a 267,9 mm², seguido pelo grupo com revestimento, sem óleo (Grupo 4 = AACPD: 193,6 mm²) e o grupo tomate não revestido (Grupo 5, AACPD: 169,6 Ver Figura 35a, Quadro 1N do Apêndice N).

Paralelamente, tomates aleatórios foram cortados a cada dia de avaliação para mostrar o avanço do fungo dentro da estrutura do tomate. Após 3 d de incubação, não foram observados danos internos nas cavidades loculares do tomate, com as placentas permanecendo com coloração esverdeada. A partir do sexto dia de incubação, começam a ser observadas alterações nas cavidades locais, onde foi possível visualizar manchas no epicarpo de tomates do Grupo 4. Após o 12º dia de incubação, os tomates tratados com revestimentos contendo micropartículas (p. OECc 0,5% e p. OECc 0,25%) mostraram que, embora o fungo tenha colonizado a ferida, sua atividade foi interrompida a ponto de não permitir seu avanço e aparentar uma ferida com aspecto cicatrizado. Internamente, os tomates não tiveram suas columelas e cavidades loculares afetadas. Por sua vez, nos demais grupos de tomates, inclusive os tratados com revestimento contendo o óleo essencial livre, observou-se um avanço agressivo e devastador do fitopatógeno desde o ponto equatorial do pericarpo do tomate com coloração branca (possível formação de micélio vegetativo) como crateras negras (possível esporulação do patógeno). Internamente, nesses tomates com textura reduzida, foram observados danos na columela e desprendimento de material placentário em seus lóculos (Figura 35b).

a)



b)

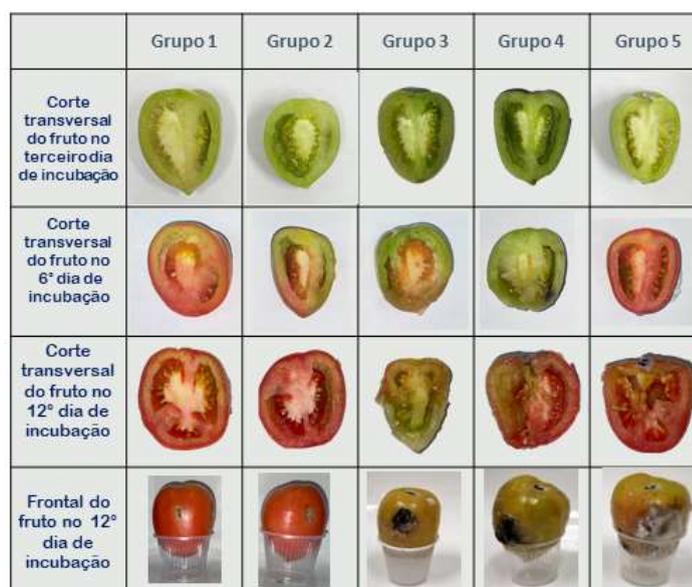


Figura 35 – Avaliação antifúngica *in situ* dos revestimentos bioativos sobre o efeito de *A. alternata* durante o armazenamento de tomates. a) Gráfico de AACPD em função do tempo de armazenamento; b) Mudanças estruturais dos tomates revestidos em função do tempo de inoculação do patógeno. Grupo 1: Tomates revestidos com a emulsão formadora de filme EFF1 contendo micropartículas 0,50%; Grupo 2: Tomates revestidos com a EFF2 contendo micropartículas 0,25%; Grupo 3: Tomates revestidos com a EFF3 contendo 0,25% de óleo livre de *C. citratus*; Grupo 4: Tomates revestidos com a EFF4 (micropartículas sem OE); Grupo 5: Tomates não revestidos.

7.2.6. AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DE TOMATES REVESTIDOS DURANTE ARMAZENAMENTO

Em um experimento independente ao estudo antifúngico *in situ*, foram avaliados os parâmetros relacionados com a qualidade dos tomates independentes revestidos e

armazenados a 25 °C sem controle de umidade. Os parâmetros analisados foram perda de peso, mudança de cor instrumental, textura por punção, sólidos solúveis totais, pH, acidez titulável e índice de maturação.

7.2.6.1. Perda de peso dos tomates

A diferença entre o peso antes do revestimento e o peso dos tomates após 9 d de armazenamento possibilitou a determinação da perda de peso fisiológica entre os diferentes grupos. Os diferentes grupos de tomates a 25 °C apresentaram uma porcentagem de perda de peso entre 6,2 e 7,4% (Figura 36). A partir da análise de variância dos dados não paramétricos, pode-se determinar que os grupos de tomates revestidos não tiveram uma perda de peso significativamente diferente do grupo não tratado (Grupo 5) ($p < 0,05$, Quadro 10 do Apêndice O).

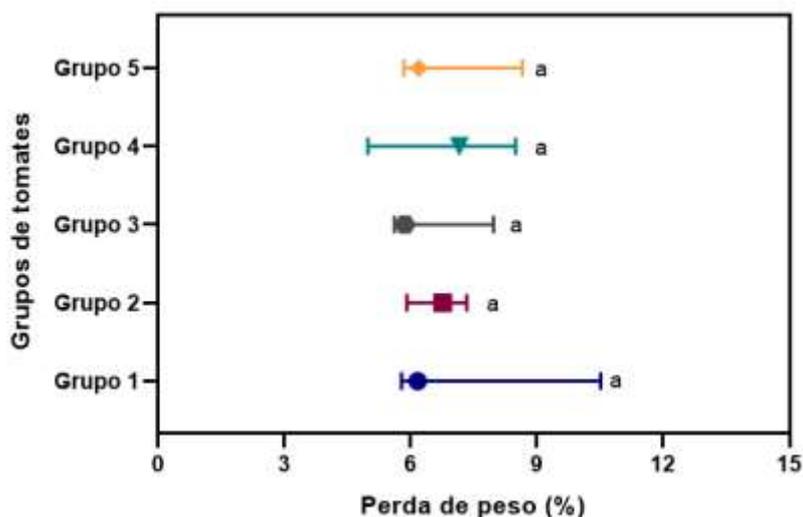


Figura 36 – Porcentagem de perda de peso de tomates revestidos durante armazenamento de 9 d a 25 °C. A letra a indica que não há diferenças significativas entre as medianas das porcentagens de perda de peso dos frutos revestidos e o grupo de controle (Grupo 5) de acordo ao pós-teste de comparações múltiplas Dunn ($p < 0,05$). Grupo 1: Tomates revestidos com a emulsão formada de filme EFF1 (micropartículas 0,50%); Grupo 2: Tomates revestidos com a EFF2 (micropartículas 0,25%); Grupo 3: Tomates revestidos com a EFF3 (óleo livre de *C. citratus* 0,25%); Grupo 4: Tomates revestidos com a EFF4 (micropartículas sem OE); Grupo 5: Tomates não revestidos.

7.2.6.2. Determinação da cor instrumental de tomates revestidos

A coloração de tomates independentes tratados com revestimentos contendo ou não micropartículas foi avaliada por meio da análise dos atributos quantitativos de luminosidade, saturação e matiz, bem como da relação cromática a^*/b e da mudança total de cor (Figura

37). As análises de luminosidade da cor dos tomates expressas pelas coordenadas L^* durante o armazenamento mostraram uma tendência decrescente para todos os grupos (Figura 37a). Entretanto, para o último dia de avaliação colorimétrica, o grupo de tomates não revestidos (Grupo 5) apresentou a maior redução percentual (27%) nos valores de L^* , enquanto os frutos do grupo 4 (revestimento branco) e dos grupos 1 e 2 (contendo 500 e 250 ppm de micropartículas) apresentaram uma redução porcentual menor (8,41, 12 e 10,3%, respectivamente), o que poderia indicar uma mudança de uma cor mais escura em tomates não revestidos (consulte a Quadro P1 do Apêndice P). Além disso, foram identificadas diferenças significativas nos grupos de tomates revestidos e no tempo de estocagem, e houve uma interação considerável entre esses fatores ($p = 0,0063$) ao analisar a variação da cor verde para vermelha expressa pela coordenada cromática a^* (Figura 37b). Os tomates quando revestidos apresentaram valores dentro da faixa de -8,3 a -7, indicando uma coloração no quadrante verde. De acordo com a análise estatística nos diferentes dias de amostragem, os valores da coordenada a^* nos tomates do grupo de controle e dos outros grupos revestidos apresentaram diferenças significativas no nono dia de armazenamento. Em contraste com o grupo revestido com óleo livre de *C. citratus* (Grupo 3), os frutos revestidos com partículas de óleo (Grupo 1 e Grupo 2) e sem óleo (grupo 4) apresentaram diferenças significativas menores com valores médios de a^* de 17, 17 e 9,3, respectivamente, em comparação com o grupo de controle com um valor de 28, o que pode indicar uma tendência mais lenta dos tomates revestidos de atingir uma cor avermelhada. Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos ao analisar a variação da coordenada b^* em cada dia de avaliação, mas os tomates tiveram uma tendência crescente na coloração amarelada durante o armazenamento (Figura 37c, Quadro P3 do Apêndice P).

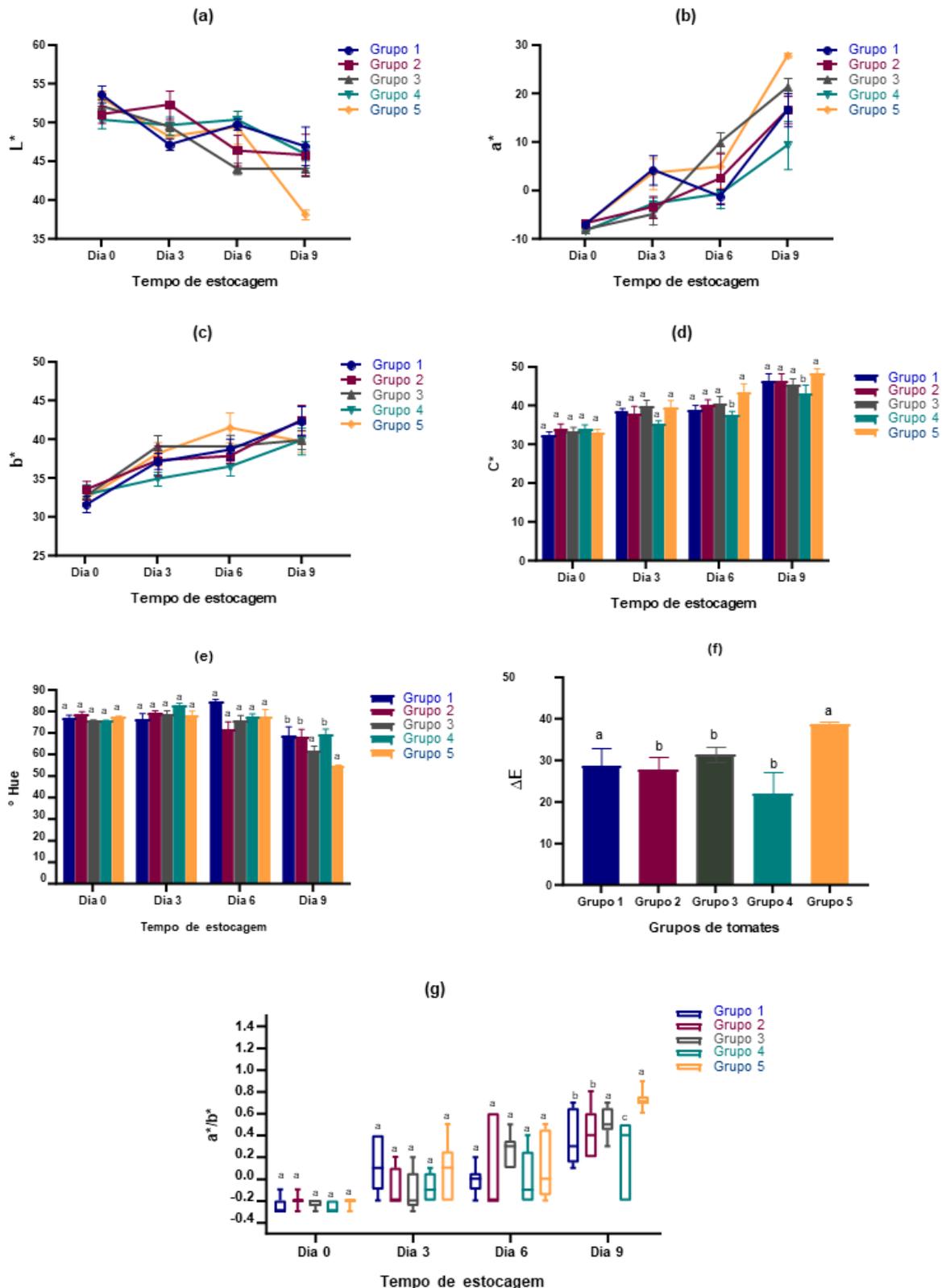


Figura 37 – Avaliação de parâmetros de cor dos tomates revestidos durante seu armazenamento. Box representam as medianas dos valores e o percentil 5 e 95%. a) L*: luminosidade; b) coordenada a*: de verde a vermelho; c) coordenada b*: de azul a amarelo; d) C*: croma ou saturação de cor; e) °Hue: tonalidade de cor; f) ΔE: diferença total de cor entre o dia inicial e final de monitoramento; g) a*/b*: diferença de cor no grau de maturação. As letras sobscritas em cada dia de avaliação (a – d)

indica diferenças significativas entre as medianas das porcentagens de perda de peso dos frutos revestidos e o grupo de controle (Grupo 5) de acordo ao pós-teste de comparações múltiplas Dunn ($p < 0,05$). Grupo 1: Tomates revestidos com a emulsão formada de filme EFF1 (micropartículas 0,50%); Grupo 2: Tomates revestidos com a EFF2 (micropartículas 0,25%); Grupo 3: Tomates revestidos com a EFF3 (óleo livre de *C. citratus* 0,25%); Grupo 4: Tomates revestidos com a EFF4 (micropartículas sem OE); Grupo 5: Tomates não revestidos.

Por outro lado, na Figura 37d é ilustrado que o grupo 4 foi o único que apresentou uma variação da saturação de cor (C^*) significativamente menor em comparação com o grupo de tomates no revestidos a partir do sexto e nono dia de armazenamento. Ao final do armazenamento dos tomates se observaram cores mais opacos. Enquanto isso, as variações na tonalidade da cor do tomate foram baixas, com tendência decrescente durante os 9 d de avaliação (Figura 37e). As diferenças entre os grupos só foram observadas a partir do 9º dia de armazenamento após o revestimento, em que o grupo de tomates não revestidos apresentou uma tonalidade significativamente diferente ($p < 0,05$) com grau médio menor ($^{\circ}\text{Hue} = 55^{\circ}$) do que os outros grupos tratados com coberturas com óleo essencial encapsulado ($^{\circ}\text{Hue} = 69^{\circ}$ a 70°). Isso significa que, a partir do último dia de avaliação, os tomates não revestidos tendem a apresentar uma cor mais amarelada com uma tendência mais pronunciada para uma cor avermelhada, um possível sinal de amadurecimento do tomate. Por sua vez, os dados com distribuição heteroscedástica da diferença total de cor entre o dia inicial e o final do monitoramento de cor dos tomates ($p < 0,05$) revelam uma diferença moderada entre os grupos 2, 3 e 4 em relação ao grupo de controle com um valor maior que 36 (Figura 37f). A relação entre as coordenadas cromáticas a^*/b^* aumentou durante os 9 dias de avaliação (Figura 37g), indicando mudanças no grau de amadurecimento dos tomates. No último dia, apenas o grupo de controle de tomates tem um valor acima de 0,6, o que pode indicar um grau diferente de amadurecimento em comparação com os tomates revestidos ($a^*/b^* = 0,2$ a $0,4$).

7.2.6.3. Monitoramento da textura dos tomates revestidos

A Figura 38 mostra os resultados dos testes mecânicos de textura por punção no epicarpo de dois tomates revestidos durante o tempo de armazenamento com temperatura controlada. A força máxima de penetração de todos os grupos tendeu a diminuir gradualmente até o sexto dia de avaliação, mas sem apresentar diferenças entre os frutos

revestidos e o grupo de controle. No entanto, no nono dia, os tomates independentes dos grupos 2, 3 e 4 apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo de tomates não revestidos, com valores de força acima de 15 N (Quadro Q1 do Apêndice Q).

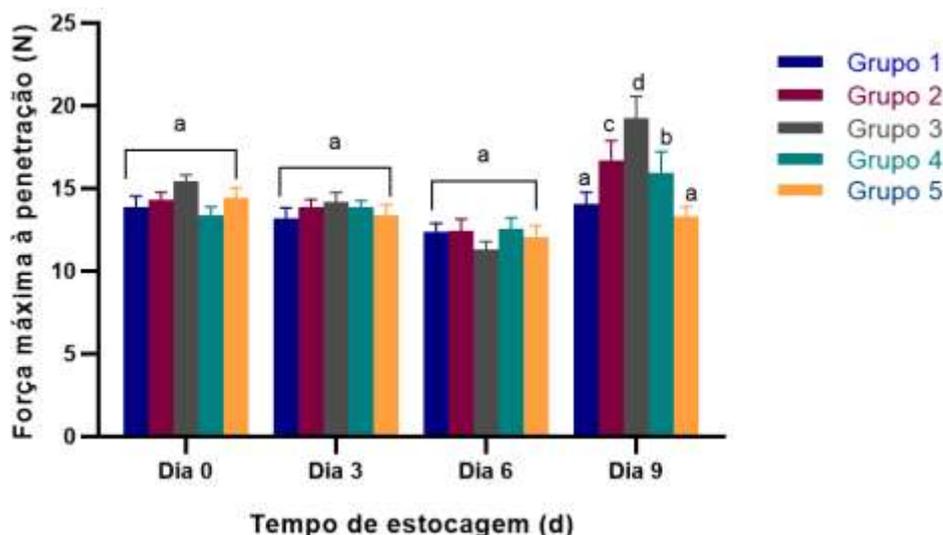


Figura 38 – Mudanças de textura pelo teste mecânico de punção em tomates revestidos durante o período de armazenamento de 9 d a 25 °C. Grupo 1: Tomates revestidos com a emulsão formada de filme EFF1 (micropartículas 0,50%); Grupo 2: Tomates revestidos com a EFF2 (micropartículas 0,25%); Grupo 3: Tomates revestidos com a EFF3 (óleo livre de *C. citratus* 0,25%); Grupo 4: Tomates revestidos com a EFF4 (micropartículas sem OE); Grupo 5: Tomates não revestidos.

7.2.6.4. Avaliação das mudanças do pH em tomates revestidos

Do mesmo modo, as variações de pH da polpa dos tomates revestidos nos diferentes grupos foram monitoradas periodicamente durante 9 dias (Figura 39). Com base na análise estatística, o tratamento de revestimento e o período de armazenamento dos frutos influenciam os valores de pH da polpa, com uma forte interação entre os dois fatores, tempo de armazenamento e revestimento (valor $p < 0,001$, Quadro R1 do Apêndice R). Os tomates com cor verde após aplicação e a secagem do revestimento no dia inicial tiveram um pH ácido em uma faixa média de pH entre 4,20 e 4,31. No entanto, a partir do dia 9º de observação, observou-se uma redução do pH entre 5,85 e 5,01% nas amostras de frutos tratados com revestimentos contendo o óleo essencial de *C. citratus*, enquanto a redução do pH durante o armazenamento nos grupos 4 e 5 foi entre 3,46 e 3,54%, o que poderia indicar alterações químicas relacionadas ao amadurecimento dos frutos.

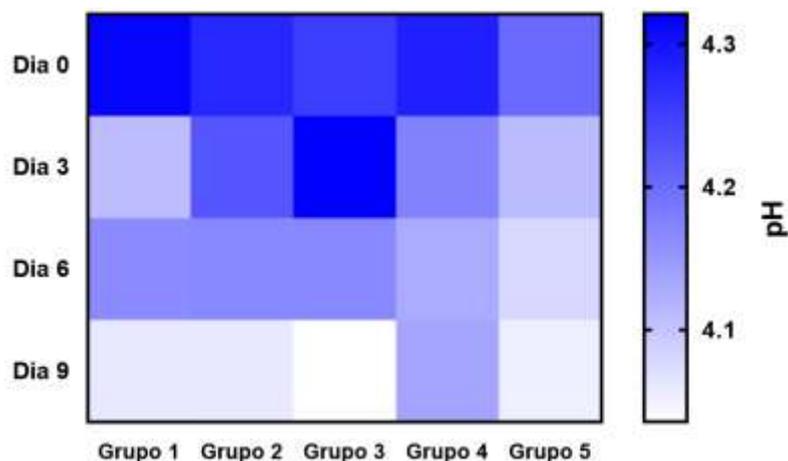


Figura 39 – Variações de pH da polpa de tomates tratados com revestimentos bioativos. Grupo 1: Tomates revestidos com a emulsão formada de filme EFF1 (micropartículas 0,50%); Grupo 2: Tomates revestidos com a EFF2 (micropartículas 0,25%); Grupo 3: Tomates revestidos com a EFF3 (óleo livre de *C. citratus* 0,25%); Grupo 4: Tomates revestidos com a EFF4 (micropartículas sem OE); Grupo 5: Tomates não revestidos.

7.2.6.5. Avaliação do efeito de revestimentos bioativos sobre SST em tomates

Da mesma forma, as polpas dos tomates revestidos que foram analisadas quanto ao pH também foram analisadas quanto ao teor de SST durante todo o período de armazenamento. Ao considerar analisar o efeito principal comparativo entre os grupos, o grupo 1, revestido com óleo essencial microencapsulado a 0,50%, mostra uma forte diferença significativa em relação ao conteúdo de SST do grupo não tratado (Grupo 5) durante todo o tempo de monitoramento (Figura 40a – Quadro S1). Ao contrário da redução do pH na polpa de dois tomates durante o experimento, o teor de sólidos solúveis totais (SST) apresentou um aumento médio consideravelmente maior no grupo 1 e no grupo 3 de 9,3 e 6,99%, enquanto nos outros grupos houve o menor aumento, com valores na faixa de 1,9 a 3,7% (Figura 40b).

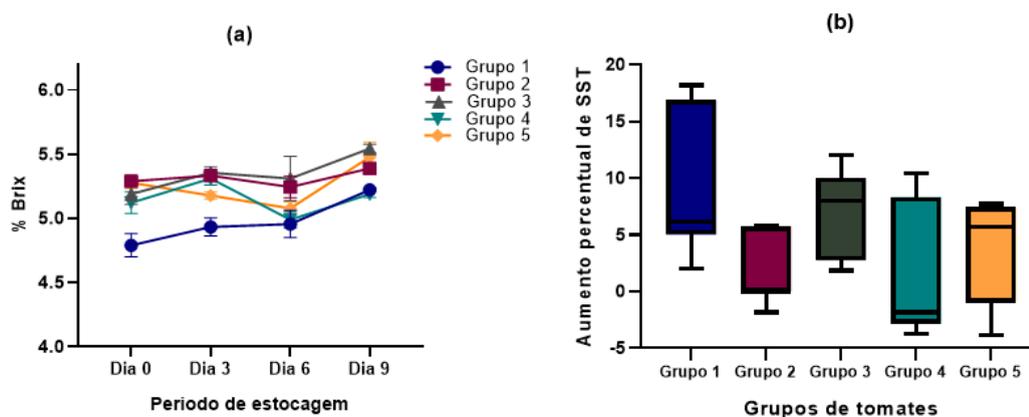


Figura 40 – Efeito dos sólidos solúveis totais em tomates revestidos. Grupo 1: Tomates revestidos com a emulsão formada de filme EFF1 (micropartículas 0,50%); Grupo 2: Tomates revestidos com a EFF2 (micropartículas 0,25%); Grupo 3: Tomates revestidos com a EFF3 (óleo livre de *C. citratus* 0,25%); Grupo 4: Tomates revestidos com a EFF4 (micropartículas sem OE); Grupo 5: Tomates não revestidos.

7.2.6.6. Análises de acidez titulável

De acordo com a análise de variância, os diferentes revestimentos não têm influência sobre a porcentagem de acidez dos tomates durante os 6 dias de armazenamento, em contraste com o tempo de armazenamento (Figura 41). Para o 9º dia de avaliação, observa-se que o grupo 1 e o grupo 3 apresentam diferenças significativas em relação à porcentagem de acidez titulável dos tomates (Consulte Quadro T1 do Apêndice T). Esses dois grupos apresentaram teores de 0,630% e 0,648% de ácido cítrico em relação ao grupo controle com valores de acidez titulável de 0,534% ao final do período.

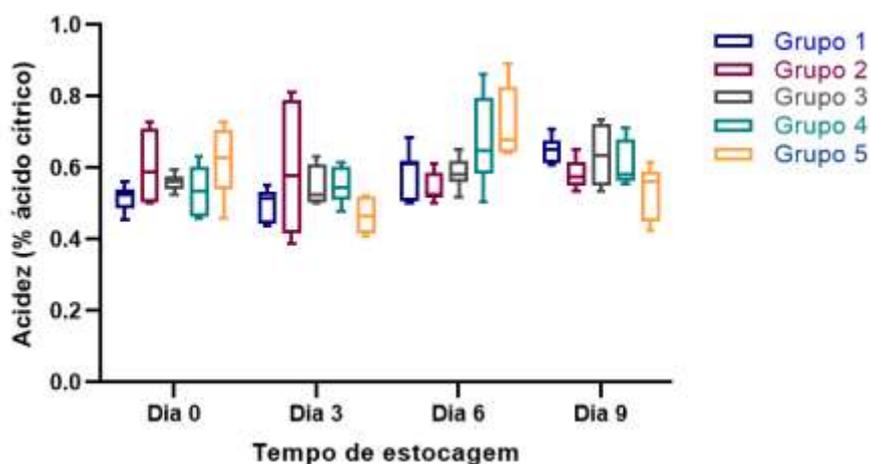


Figura 41 – Determinação da porcentagem de acidez total em tomates revestidos durante seu armazenamento a 25 °C. Grupo 1: Tomates revestidos com a emulsão formada de filme EFF1 (micropartículas 0,50%); Grupo 2: Tomates revestidos com a EFF2 (micropartículas 0,25%); Grupo 3:

Tomates revestidos com a EFF3 (óleo livre de *C. citratus* 0,25%); Grupo 4: Tomates revestidos com a EFF4 (micropartículas sem OE); Grupo 5: Tomates não revestidos.

7.2.6.7. Identificação do índice de maturação de tomates revestidos

O índice de maturação dos frutos independentes durante o período de análise não foi influenciado pelo revestimento em que estavam submersos no início do teste. Apesar da alta variedade do índice de maturação entre os tratamentos, expressa pelas flutuações nas porcentagens de acidez total nas polpas dos tomates durante os dias de monitoramento, observa-se que ao final do período de avaliação o nível de maturação dos tomates não revestidos foram estatisticamente diferentes no grupo de tomates revestidos com micropartículas (Figura 42, consulte Quadro U1 do Apêndice U).

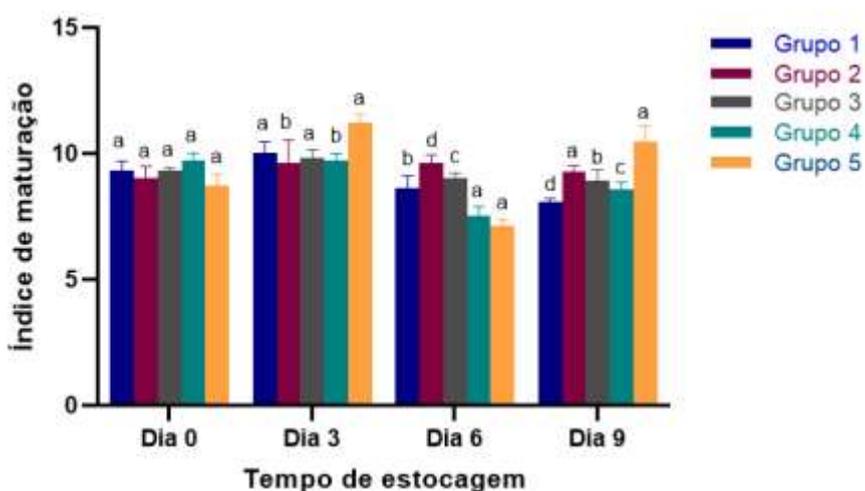


Figura 42 – Índice de maturação dos frutos tratados com revestimentos bioativos. Grupo 1: Tomates revestidos com a emulsão formada de filme EFF1 (micropartículas 0,50%); Grupo 2: Tomates revestidos com a EFF2 (micropartículas 0,25%); Grupo 3: Tomates revestidos com a EFF3 (óleo livre de *C. citratus* 0,25%); Grupo 4: Tomates revestidos com a EFF4 (micropartículas sem OE); Grupo 5: Tomates não revestidos.

8. DISCUSSÃO

8.1. DISCUSSÃO DO ESTUDO 1

Thielaviopsis ethacetica tem sido considerado nos últimos anos um fitopatógeno de alto impacto em culturas industriais e alimentícias (BORGES *et al.*, 2019). Entre os alimentos afetados, destaca-se seu impacto sobre a banana, uma das culturas de grande importância socioeconômica e nutricional na região neotropical (DE MELO *et al.*, 2016). Dessa forma, o presente estudo buscou identificar o potencial de dois óleos essenciais de plantas nativas (*Annona acutiflora* e *Xylopia ochrantha*), uma planta aromática (*Cymbopogon citratus*) e o cinamaldeído na forma emulsionada, para o controle *in vitro* de *T. ethacetica* e seu efeito nas propriedades físico-químicas da banana durante o armazenamento.

De acordo com a análise química CG-MS/FID, o patógeno foi exposto predominantemente a sesquiterpenos hidrocarbonetos quando tratado com os óleos essenciais de *A. acutiflora* (OE_{Aa}) e *X. ochrantha* (OE_{Xo}). Dentre os óleos testados, o óleo essencial de *A. acutiflora* destacou-se por ter atividade fungistática preliminar sobre o conídio do patógeno, por isso foi necessário avaliar se sua combinação com cinamaldeído melhoraria seu efeito. A emulsificação de cinamaldeído puro ou em sua combinação com o óleo de *A. acutiflora* mostrou atividade fungicida contra esporos de *T. ethacetica* abaixo de 1000 ppm e um efeito de retardo do crescimento micelial do patógeno. Além disso, as emulsões de cinamaldeído ou sua combinação com OE_{Aa} reduziram a viabilidade das células fúngicas durante a maturação das bananas durante 9 d de armazenamento. Satisfatoriamente, ambas as emulsões não afetaram os parâmetros instrumentais de cor, textura, sólidos solúveis totais, pH, acidez e índice de maturação das bananas durante o armazenamento a 25 °C.

O perfil químico do óleo de *A. acutiflora* apresentado neste estudo apresentou uma série de variações em comparação com um estudo publicado por Folly *et al.* (2021) que estudou a composição do óleo da mesma espécie na mesma área de conservação. O autor descreveu o α -santaleno como o principal constituinte do óleo (15,5%), seguido pelo biciclogermacreno (12,5%). Enquanto isso, este trabalho relatou o sesquiterpeno biciclogermacreno como o principal componente (37%), seguido pelo (E)- β -farneseno (11,8%). Em contraste com o presente trabalho, Folly *et al.* (2021) relataram a presença de

quantidades residuais de hidrocarbonetos monoterpenos, que não foram identificados neste estudo. Ao mesmo tempo, o presente estudo apresenta divergências entre os cálculos majoritários do relatório químico determinado por Viana *et al.* (2023), cujo estudo mostra as folhas de *Xylopiya ochrantha* coletadas no PNRJ durante o inverno de 2019. O estudo indica os hidrocarbonetos sesquiterpenos germacreno D, biciclogermacreno e δ -elemeno como os principais constituintes presentes no óleo de *X. ochrantha*. Entanto, há uma predominância comum de hidrocarbonetos sesquiterpenos nos dois óleos essenciais da mesma planta coletados em períodos diferentes. As diferenças entre o perfil químico identificado neste trabalho e em estudos anteriores podem se atribuir a fatores sazonais e climáticos encontrados nas espécies, como temperatura média, precipitação e umidade, conforme relatado em estudos químicos comparativos em outras espécies (SAMPAIO *et al.*, 2020).

Por outro lado, o óleo essencial de *C. citratus* (capim-limão), que apresentou atividade antifúngica promissora contra o desenvolvimento de conídios de *T. ethacetica* em condições *in vitro*, tem predominância de monoterpenos oxigenados, diferentemente dos dois óleos essenciais extraídos de material vegetal do ecossistema de Restinga. O estudo de Carvalho *et al.* (2013) determinou que o óleo essencial de duas espécies do gênero *Lippia*, que são ricos em monoterpenos oxigenados em diferentes proporções, apresentaram efeitos contrários contra *T. paradoxa* (CARVALHO *et al.*, 2013). De acordo com os autores, o óleo essencial de *Lippia sidoides*, tendo como constituintes majoritários timol (42,33%), p-cimeno (11,97%) e β -cariofileno (11,03%), aplicado entre 0,2 a 3,0 ppm (v/v) foi capaz de inibir 100% do desenvolvimento micelial de *T. paradoxa* e conseqüentemente sua esporulação (CARVALHO *et al.*, 2013). Entretanto, ao testar o óleo essencial de *Lippia gracilis*, constituído principalmente por carvacrol (27,59%), timol (18%), p-cimeno (16,24%), nas mesmas concentrações ele permitiu o crescimento micelial do patógeno similar ao da placa controle e o processo de esporulação, atingindo uma concentração acima de 7×10^6 conídios mL⁻¹ (CARVALHO *et al.*, 2013). Ao testar os padrões presentes nos óleos como timol, carvacrol, p-cimeno, 1,8 cineol, α -terpineno e β -cariofileno nas concentrações de 0,05 a 0,50 ppm (v/v), apenas o timol na concentração de 0,30 ppm atingiu 100% de inibição micelial de *T. paradoxa* (CARVALHO *et al.*, 2013). Cruz *et al.* (2018), no mesmo Estado de Sergipe, relataram que um genótipo de óleo de *L. gracilis* com timol como seu principal componente e outros seis genótipos constituídos principalmente por carvacrol (35% - 49,25%) com baixas porcentagens de timol (< 5%), apresentaram o mesmo perfil antifúngico contra *T. paradoxa*,

inibindo completamente o micélio do patógeno a partir de concentrações de 450 ppm (m/v). Os autores também relataram inibição micelial total do patógeno com a aplicação de timol e carvacrol a 180 ppm (CRUZ *et al.*, 2018). Essas descobertas da literatura existente revelam que a atividade antifúngica de um derivado de planta em um patógeno não depende necessariamente da composição química, mas também da suscetibilidade de cada uma das cepas testadas, portanto, é necessário avaliar individualmente o mecanismo de ação de cada derivado vegetal.

Além disso, a hipótese de que a nanoemulsificação de derivados vegetais potencializa as propriedades antifúngicas foi comprovada neste estudo. Quando comparadas ao óleo essencial, as nanoemulsões preparadas com baixo consumo de energia (Ne-OECC e NE-OEAa) aumentaram o efeito inibitório dos bioprodutos em concentrações mais baixas do que o óleo essencial emulsionado em DMSO. Da mesma forma, o potencial antifúngico do cinamaldeído e da combinação cinamaldeído-óleo de *A. acutiflora* em *T. ethacetica* foi favorecido pela emulsificação, quando a atividade fungicida *in vitro* foi observada contra o patógeno (Figura 21). Achados semelhantes foram feitos por Yadav *et al.* (2021), que descobriram que uma nanoformulação contendo os óleos essenciais (EO) de *Myristica fragrans* Houtt, *Bunium persicum* Boiss e *Zanthoxylum alatum* Roxb permitiu melhorar a atividade antifúngica e antiaflotoxina B1 contra o fungo *Aspergillus flavus*, exibindo concentrações inibitórias mais baixas do que a formulação combinada. De acordo com os autores, o aprimoramento bioativo pela nanoformulação contendo óleo pode ser devido ao fato de as nanoemulsões aumentarem a solubilidade e permitirem a liberação regulada de ingredientes ativos derivados de plantas (YADAV *et al.*, 2021). Por sua parte, Hou *et al.* (2022) identificaram que, apesar de a nanoemulsão à base de D-limoneno ter obtido a maior concentração inibitória do derivado vegetal em solução sobre patógenos alimentares, como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* e *Escherichia coli*, essa nanoformulação obteve concentrações fungicidas mais baixas sobre esses patógenos. Em contraste, o estudo de Cruz *et al.* (2018) relataram que o óleo essencial de *Lippia gracilis* induziu ação fungistática contra *Thielaviopsis paradoxa* (identificado como o agente etiológico da hemorragia do caule do coco), em concentrações que variam de 230 a 260 ppm, enquanto a nanoemulsão de derivados vegetais demonstra atividade inibitória a uma concentração mais elevada com valor CIM de 600 ppm (CRUZ *et al.*, 2018).

Por outro lado, ainda que as nanoemulsões OEAA e OEXO preparadas com baixa entrada de energia não tenham atingido 100% de inibição sobre o patógeno, elas apresentaram um tamanho de gotícula em escala nanométrica ($Z < 200$ nm) e alta homogeneidade em sua distribuição ($PDI < 0,3$) de acordo com Anarjan *et al.* (2014), com valores semelhantes aos relatados por Folly *et al.* (2021) e Viana *et al.* (2023). No entanto, devido a que as gotículas das nanoformulações apresentam uma carga elétrica superficial inferior a -30 mV, a nanoemulsão não pôde ser fisicamente estabilizada por repulsão eletrostática (MÜLLER; JACOBS; KAYSER, 2001). Considerando que os valores do potencial zeta de uma nanoformulação dependem do pH e os eletrólitos encontrados na fase aquosa, o perfil químico do óleo essencial, pode ajudar na estabilização das nanoemulsões (MÜLLER; JACOBS; KAYSER, 2001).

Da mesma forma, as emulsões grosseiras feitas em um volume maior com o surfactante não iônico Tween 80 com alta entrada de energia foram avaliadas na vida útil da banana, apresentando valores semelhantes acima de $D_{4,3}$ de 5000 nm com o estudo de Campolo *et al.* (2020), quando a emulsão do óleo essencial de anis (*Pimpinella anisum*) misturado com Tween 80 não foi sonificada. Essas emulsões também apresentaram uma distribuição heterogênea que pode levar as gotículas a coalescerem umas com as outras e se desestabilizarem, embora por mais de 30 d em temperatura ambiente não tenha sido observada nenhuma separação de fase das emulsões.

Diferentemente da emulsão de cinamaldeído, a emulsão combinada de OEAA-Cin apresentou potencial zeta (ζ) acima de -30 mV, de modo que sua estabilização física pode ser devida ao mecanismo de impedimento esférico por ter usado um tensoativo não iônico que expressa valores negativos de mobilidade eletroforética (ζ) (RIBES *et al.*, 2017). As emulsões primárias desenvolvidas neste estudo poderiam futuramente atingir uma escala nanométrica ao implementar o método de sonificação em um banho frio para reduzir o tamanho das gotículas e melhorar sua distribuição, evitando a degradação do óleo devido ao calor gerado (CAMPOLO *et al.*, 2020).

Do ponto de vista microbiológico, o óleo essencial de *C. citratus*, tanto em sua forma livre quanto emulsificada, foi favorável à inibição dos conídios de *T. ethacetica*. No entanto, esse derivado vegetal a 20.000 ppm não foi capaz de inibir o crescimento micelial do patógeno. Ao contrário dos resultados deste estudo, Pereira *et al.* (2018) identificaram que um óleo essencial de *C. citratus* procedente do Estado de Goiás e aplicado a uma

concentração de 7500 ppm inibiu o crescimento micelial completamente do micélio previamente ativado de *T. paradoxa*.

Considerando a excelente atividade fungistática do óleo essencial de *A. acutiflora*, foi avaliado se a combinação com um composto com potencial antimicrobiano, como o cinamaldeído, melhoraria seu potencial antifúngico *in vitro* e *in situ*. A atividade fungistática da emulsão misturando o óleo de *A. acutiflora* (OEAA) com cinamaldeído (Cin) foi melhorada porque continha metade da concentração do derivado do OEAA em comparação com quando foi testado puro na forma livre, de forma que esta emulsão expressou a mesma concentração inibitória sobre o patógeno (Figura 21). Além disso, nessa condição, a emulsão combinada de OEAA-Cin apresentou uma concentração fungicida menor (CFM: 500 ppm) do que quando ambos os derivados de plantas foram testados em conídios em meio líquido livre (CFM: 2000 ppm).

O cinamaldeído, um derivado reconhecido como seguro para alimentos (GRAS) com a capacidade de evitar a deterioração microbiana dos alimentos (SUN *et al.*, 2020), demonstrou ter atividade inibitória, fungicida e afetar o desenvolvimento micelial de *T. ethacetica* (Figura 22). Ainda não há consenso sobre os mecanismos de ação do cinamaldeído em fungos filamentosos, mas foi afirmado que esse derivado vegetal causa danos celulares e afeta o material citoplasmático, além de ser capaz de inibir ATPases e enzimas que participam dos biossinteses da parede celular fúngica (SUN *et al.*, 2020).

Um caso interessante foi observado na atividade das emulsões formuladas, nas quais elas se mostraram eficientes na inibição do desenvolvimento de conídios em um meio nutricional líquido, mas não tanto quando expostas ao micélio do patógeno. Embora a nanoemulsão de cinamaldeído tenha gerado uma taxa mais alta de retardamento do crescimento do fungo do que a nanoemulsão combinada de óleo de *A. acutiflora* e cinamaldeído (E-AaCin), elas não inibiram completamente seu desenvolvimento em meio nutritivo solidificado. Esse fenômeno também foi relatado por (RIBES *et al.*, 2017), identificando que a forma nanoemulsionada dos óleos essenciais de limão (*Citrus limon* L.) e bergamota (*Citrus bergamia*) apresentou uma redução na atividade antifúngica micelial sob o fungo *Aspergillus niger* em comparação com o potencial dos derivados vegetais em sua forma livre. Os autores aludiram que a atividade antimicrobiana das emulsões poderia ser devida à partição das gotículas dos derivados voláteis de plantas e os presentes na fase aquosa (RIBES *et al.*, 2017). Por exemplo, o cinamaldeído tem um coeficiente de partição n-

octanol/água (Log Pow) de 1,9 (calculado pelo XLogP3 3.0), enquanto o biciclogermacreno, o principal componente do óleo essencial de *A. acutiflora* tem um Log Pow de 4,1 (calculado pelo método XLogP3-AA) (NCBI, 2020). Dessa forma, a emulsão que continha apenas cinamaldeído, um composto com Log Pow 2 vezes menor do que o biciclogermacreno, poderia se dissolver mais facilmente na fase aquosa e permitir sua liberação contínua até gerar uma afetação sobre o patógeno-alvo. Além disso, é necessário salientar que, com base nas descobertas de Cruz *et al.* (2018), foram identificadas mudanças na composição química das emulsões, possivelmente devido a processos de oxidação, rearranjo ou outras transformações das substâncias presentes nos óleos essenciais, em que o perfil antifúngico das emulsões também pode variar ao encapsular as substâncias por emulsificação. No entanto, essas hipóteses precisam ser testadas em próximas pesquisas.

Por outro lado, o efeito das emulsões foi avaliado em aspectos microbiológicos e físico-químicos da banana da variedade ouro durante seu armazenamento, controlando as condições de temperatura e umidade. As emulsões E-cin e E-AaCin a 5.000 ppm reduziram significativamente as populações de espécies de fungos filamentosos expressas pelas unidades formadoras de colônias presentes nas frutas em 30 e 12%, o que poderia indicar que o tratamento das bananas com essas emulsões poderia reduzir a carga fúngica contaminantes que degradaria as frutas durante o processo de armazenamento antes da comercialização da fruta. Esses resultados *in situ* em frutos estão relacionados ao perfil observado no teste *in vitro* de microdiluição usando uma suspensão de conídios do patógeno.

A banana é uma fruta climatérica que se caracteriza pelo amadurecimento durante o armazenamento (HOU *et al.*, 2022). Assim, o presente estudo também buscou avaliar o efeito de emulsões submersas em emulsões de E-cin e E-AaCin sob a vida útil da banana (*Musa acuminata* 'Lady Finger'), popularmente conhecida como banana ouro. De acordo com as diferentes análises físico-químicas destrutivas e não destrutivas, essas bioformulações não afetaram o processo normal de amadurecimento da banana durante 10 d de armazenamento a 25 °C. Entretanto, durante o período de monitoramento, foram observadas variações relevantes desde o período pré-climático até a maturação comercial. As mudanças de cor em muitas frutas, especialmente nas bananas, são um dos principais indicadores do estado de maturação (THOMPSON; SUPAPVANICH; SIRISON, 2019) e é um aspecto que influencia a aceitabilidade comercial da fruta (HOU *et al.*, 2022). As variações

na coordenada a^* (verde-vermelho) identificadas neste estudo podem indicar a decomposição da clorofila pela clorofilase e o aumento de pigmentos como xantofila e caroteno, resultando em uma mudança visual na cor de verde para amarelo (PRABHA; BHAGYALAKSHMI, 1998). Além disso, após o quinto dia de avaliação, foi observada uma redução nos valores de luminosidade - L^* e na cor amarelada das bananas (valores positivos de b^*) (Figura 24), o que pode estar associado à atividade do polifenol oxidase na conversão do fenol em quinina, bem como ao aumento de macromoléculas devido à polimerização que causam uma cor mais escura nas cascas das bananas, tendendo a uma cor marrom em um estado de sobrematuração (DAS *et al.*, 2023). Da mesma forma, conforme relatado por Das *et al.* (2023), em que se avaliou bananas tratadas com um revestimento bioativo, o índice de ângulo de tom amarelo das bananas nas frutas foi ligeiramente reduzido ao longo do tempo em todos os grupos com a mesma proporção. O monitoramento da tonalidade das bananas é essencial, pois a intensidade da cor amarela da casca é comumente relacionada à doçura, ao bom sabor e ao frescor, de modo que os consumidores são atraídos a escolher bananas com uma cor amarelada mais brilhante (DAS *et al.*, 2023).

Além disso, outra das propriedades mais reveladoras das bananas do ponto de vista comercial é a textura, uma vez que ela afeta a vida útil da fruta e também sua qualidade de armazenamento (PRABHA; BHAGYALAKSHMI, 1998). Neste estudo, a redução da textura dura dos frutos foi observada devido ao processo de amadurecimento durante o armazenamento a 25 °C. A textura dos frutos durante os primeiros cinco dias de armazenamento diminuiu com valores superiores a 30 N para uma faixa de 11 e 14 N. Em seguida, nos cinco dias seguintes, observou-se um processo de amolecimento mais lento das bananas (com valores entre 7 e 9 N) como resultado do processo de maturação. Hou *et al.* (2022) expuseram que as bananas armazenadas a 13 °C apresentaram uma redução abrupta em sua firmeza passando de valores de aproximadamente 51 N para valores entre 5 e 8 N no novo dia de armazenamento, com bananas tratadas com revestimento contendo 1 e 1,5% de nanoemulsão de D-limoneno.

Durante o processo de amadurecimento das bananas, o pH da polpa aumenta como resultado da redução do conteúdo de ácidos orgânicos, como o ácido málico e o ácido tartárico (HOU *et al.*, 2022). No presente estudo, observou-se uma leve redução do pH em todos os grupos a partir do quinto dia do armazenamento a 25 °C, mas no décimo dia houve um leve aumento. Da mesma forma, Hou *et al.* (2022) relataram uma redução no pH no terceiro dia

de armazenamento a 13 °C, mas após o sexto dia foi observado um aumento escalonado no pH nos diferentes grupos de bananas. As variações no pH da polpa de banana estão correlacionadas com as medições de acidez titulável, em que, a partir do quinto dia de armazenamento, a acidez tendeu a diminuir de valores acima de 0,55% de ácido málico para porcentagens em torno de 0,30%. Essa redução no conteúdo de ácidos orgânicos deve-se ao fato de que estes compostos atuam como substratos para as reações enzimáticas da respiração da banana (BICO *et al.*, 2009).

De forma conclusiva, pode-se afirmar que as emulsões à base de cinamaldeído puro (E-cin) ou em combinação com o óleo essencial de *A. acutiflora* (E-AaCin) apresentaram atividade fungistática e fungicida *in vitro* sobre *T. ethacetica*, bem como revelaram resultados promissores na redução da carga microbiana filamentosa no interior da banana sem afetar negativamente as propriedades físico-químicas das frutas durante o armazenamento em temperatura ambiente. Considerando as promissoras propriedades antifúngicas dessas bioformulações, sua incorporação em revestimentos comestíveis à base de biopolímeros poderia melhorar a vida útil das bananas durante o armazenamento (HOU *et al.*, 2022; YANG *et al.*, 2022).

8.2. DISCUSSÃO DO ESTUDO 2

O tomate é um produto agrícola altamente perecível devido a fatores abióticos e bióticos, entre os quais se destacam as infecções causadas por fungos fitopatogênicos (PERALTA-RUIZ *et al.*, 2020; RIZWANA *et al.*, 2021). *Alternaria alternata* (*A. alternata*) faz parte do complexo fúngico que ataca os tomates no período pós-colheita, causando a mancha preta e também produzindo micotoxinas de alto risco para a saúde humana por algumas cepas (QIN *et al.*, 2022). Assim, o presente estudo visou formular revestimentos à base de mandioca com micropartículas coacervadas contendo óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (OECc) incorporadas para avaliar seu efeito fungicida *in vitro* e *in situ* sobre o fitopatógeno *Alternaria alternata* e sobre os aspectos de qualidade do tomate armazenado. Inicialmente, a análise química do OECc revelou a presença de dois monoterpenos oxigenados e um monoterpeno hidrocarboneto como componentes principais. A triagem polimérica permitiu definir o sistema ideal para o encapsulamento do OECc por coacervação complexa o par polimérico alginato.300-gelatina tipo B na proporção

1:5 a uma temperatura de 45 °C em um pH de 4,0 ajustado com CH₃COOH. As micropartículas sob o sistema ideal apresentaram diâmetros médios D_{4,3} menores que 100 µm com valores de amplitude menores que 1,3. As partículas bioativas com morfologia circular a oval com gotículas de óleo incrustadas foram observadas por microscopia, e a presença do derivado da planta foi confirmada por espectrofotometria e cromatografia gasosa. O encapsulamento do óleo OECc aprimorou a atividade fungistática e fungicida em concentrações menores contra *A. alternata* em condições *in vitro*. Foi observado um efeito de cicatrização em tomates revestidos com micropartículas contendo o OECC a 0,50% e 0,25% sob armazenamento a temperatura e umidade controladas após 12 d de infecção artificial com conídios de *A. alternata*. Os tomates tratados com um revestimento contendo micropartículas após 9 d de armazenamento a 25 °C atrasaram a coloração comercial do epicarpo dos tomates. Considerando a relação entre o TSS e a acidez titulável da polpa de tomate, os revestimentos com micropartículas contendo OECC na concentração CFM causaram uma redução significativa no índice de maturação.

De acordo com a análise química por CG-EM/DIC, o óleo de *C. citratus* (OECc) procedente da região serrana do Estado do Rio de Janeiro é rico em monoterpenos oxigenados com a presença de alguns monoterpenos hidrocarbonetos. A composição química desse derivado de planta é descrita como sendo bastante variada em todo o mundo, conforme compilado no Quadro 1, o que poderia explicar os diferentes usos etnofarmacológicos em diferentes países (SHAH *et al.*, 2011). Particularmente, este estudo relata que o geranial (cital A), o neral (cital B) e o mirceno são os principais constituintes do óleo essencial de capim-limão. Embora as porcentagens relativas tenham variado e as técnicas de extração tenham sido diferentes, a análise química do óleo OECc do presente estudo tem semelhanças com diferentes estudos realizados no território brasileiro, indicando um padrão semelhante nos três principais constituintes mencionados (Quadro 1). Esse padrão químico foi relatado por Antonioli *et al.* (2020) estudando o OECc extraído de plantas de colhida em Caxias do Sul, RS, e Gonçalves *et al.* (2015) e Barbosa *et al.* (2008) ao avaliarem a composição química do óleo de folhas da planta em diferentes municípios do Estado de Minas Gerais, assim como Blanco *et al.* (2009) ao caracterizarem o óleo essencial OECc de material vegetal procedente de um município do interior de São Paulo. Manvitha e Bidya (2014) apontaram que o padrão do óleo essencial de *C. citratus* correspondia à presença dos dois monoterpenos estereoisoméricos, mas, no caso brasileiro, esse padrão

químico também poderia incluir o mirceno como composto de referência junto com o citral. Entretanto, essa hipótese teria de ser analisada com maior profundidade por meio de estudos sistemáticos.

Da mesma forma, como a atividade antifúngica do óleo de OECc contra *A. alternata* foi comprovada no presente estudo, as propriedades contra patógenos degradadores de frutas também foram verificadas em diferentes estudos no mundo e no Brasil. Antonioli *et al.* (2020) identificaram potencial fungicida *in vitro* e *in vivo* sobre os fitopatógenos *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* na forma livre e aprisionada em nanocápsulas, aplicando-as em maçãs como modelo experimental. Gonçalves *et al.*, (2015) identificaram o efeito inibitório do OECc sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* (agentes causais da podridão radicular e da podridão do cole do feijão), na concentração de 0,04 e 0,03%, respectivamente. No entanto, Onawunmia, Yisakb e Ogunlanaa (1984) relataram que apenas o geranial e o neral (citral) apresentaram atividade antimicrobiana sobre espécies gram-positivas e gram-negativas individualmente, ao contrário do mirceno, que não exerceu efeito antimicrobiano sobre os patógenos-alvo. No entanto, de acordo com Gonçalves *et al.*, (2015), o citral (mistura de geranial e neral) foi capaz de inibir o crescimento micelial de *R. solani* e *S. rolfsii* em concentrações mais baixas do que quando o óleo essencial puro de *C. citratus* foi aplicado.

O potencial antimicrobiano do OECc tem sido associado à ação exercida por compostos oxigenados presentes no derivado, como neral e geranial (ANTONIOLI *et al.*, 2020). Wei *et al.* (2021) determinaram que o citral causou uma redução no nível de ergosterol, aumentou a permeabilidade da membrana e diminuiu o conteúdo de proteínas solúveis, levando a danos à função e à estrutura da membrana celular de *Botryosphaeria dothidea*, *Phomopsis macrospore* e *Botrytis cinerea*, patógenos do Kiwi. Além disso, Tao, Ouyang e Jia (2014) identificaram a liberação de constituintes celulares e o aumento do pH extracelular do fungo *Penicillium italicum* após a exposição ao citral nas concentrações CIM e CFM identificadas pelos autores. Com base em estudos de efeitos sobre o ergosterol, um importante componente da membrana celular fúngica responsável por estabilizar a função e a integridade da célula, os autores determinaram um impacto considerável sobre a biossíntese do ergosterol nas células do *P. italicum*, o que levou a afirmar que o citral apresenta como principal alvo a membrana plasmática do patógeno causador do mofo azul dos citros TAO; OUYANG; JIA, 2014). Recentemente, Luo *et al.* (2024) relataram que o citral

foi capaz de prejudicar a estabilidade estrutural da membrana celular, afetando a permeabilidade da membrana celular de *A. alternata*. De acordo com os autores, o dano celular causado por esse derivado de planta conseqüentemente afetou a viabilidade lipídica da membrana, o vazamento de conteúdo celular gerou um aumento nas espécies reativas de oxigênio (ROS), o conteúdo de malonaldeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o que pode ser verificado pelo aumento da atividade das enzimas reguladoras do estresse oxidativo como a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) no ambiente celular do patógeno estudado (LUO *et al.*, 2024).

Além disso, o OECC, tanto na forma livre quanto na encapsulada, causou um efeito fungistático e fungicida sobre o patógeno *A. alternata*, conforme identificado pelo método padronizado de microdiluição dentro da faixa de concentrações testadas neste estudo. A comparação desses resultados resulta em uma tarefa complexa quando se consideram os vários métodos usados na literatura para as determinações de CIM e CFM (por exemplo, métodos de difusão, micelial e de microdiluição), a forma de preparar as concentrações testadas (v/v ou m/v, m/m), bem como a variedade de suscetibilidade de cada uma das cepas testadas em cada estudo. Por exemplo, Zorzi Tomazoni *et al.* (2019) relataram que, ao testar o óleo essencial de quatro plantas do gênero *Bacharis*, apenas duas delas, *B. ochracea* e *B. trimera*, demonstraram atividade inibitória (CIM) pelo método micelial *in vitro* contra o fungo *A. alternata*, com valores de 10,0 e 5,0 µL mL⁻¹. De acordo com o reporte dos autores, esses dois óleos essenciais com atividade promissora diferiram dos demais óleos essenciais de plantas do mesmo gênero por apresentarem predominância de monoterpenos oxigenados (49,0 e 50,9%, respectivamente), o que poderia explicar sua atividade contra *A. alternata*. Por sua vez, Wang *et al.* (2019) relataram que o citral apresenta uma concentração inibitória mínima de 0,02225% (222,5 µg mL⁻¹) sobre o desenvolvimento micelial de *A. alternata* e, na metade do valor da CIM, interferiu como uma barreira aos genes biossintéticos de micotoxinas. Isso levou ao comprometimento da produção de metabólitos perigosos desse patógeno (WANG *et al.*, 2019). Deste modo, a atividade fungicida do OECC identificada no presente estudo sob uma concentração acima de 0,06% poderia ser explicada pela atividade deletéria do citral, que é capaz de reduzir o ergosterol, levando a uma maior fragilidade fúngica devido à alteração da membrana celular de *A. alternata* (WANG *et al.*, 2019). Além disso, o citral causa condições desfavoráveis para a sobrevivência do agente da mancha preta do tomateiro, por ser capaz de reduzir a capacidade antioxidante

do fungo, o que leva ao acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio (ROS), desencadeando em células defeituosas e letais que afetam seriamente o ciclo de vida e a viabilidade do patógeno (WANG *et al.*, 2019). Porém, essas hipóteses teóricas devem ser avaliadas em estudos futuros sobre o mecanismo de ação.

Além disso, o presente estudo também confirma a hipótese teórica apresentada em diferentes estudos de que a encapsulação do óleo essencial promissor permite aprimorar a atividade antifúngica do derivado da planta de forma prolongada com base no resultado do CFM após 7 d de aplicação (Tabela 4) e no teste *in situ* após 12 d de avaliação (Figura 35). No caso da avaliação *in vitro* por meio do teste de microdiluição, a ação fungicida (expresso em valores de CFM) do OECc em ambas as formas, livre ou encapsulada, foi obtida em concentrações do derivado vegetal acima da concentração inibitória mínima. Entretanto, a ação fungicida sobre o fungo *A. alternata* na forma encapsulada foi duas vezes maior do que o valor da atividade inibitória (CIM), enquanto a forma livre exigiu uma concentração quatro vezes maior do que a CIM determinada no patógeno-alvo (Tabela 4). Um caso contrário foi relatado por Antonioli *et al.* (2020), que identificaram que o óleo essencial de *C. citratus* aprisionado na forma de nanocápsulas apresentou um valor de CIM mais alto (0,1%) do que quando o óleo essencial foi aplicado livremente (0,025%) na avaliação do desenvolvimento micelial dos fitopatógenos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Os autores argumentaram que as gotículas de óleo essencial permeiam a membrana polimérica lentamente e levam um longo tempo para entrar em contato com o meio, ao contrário do óleo livre que está em contato direto desde o início de sua aplicação (ANTONIOLI *et al.*, 2020).

Por outra parte, conforme verificado nos testes de coacervação de múltiplos complexos no presente estudo, a produção de complexos de polieletrólitos para a microencapsulação do princípio ativo da planta a partir de diferentes biopolímeros apresenta suas próprias especificidades para cada sistema polimérico. Entre as especificidades, destacam-se a concentração do polímero, a força iônica, a proporção entre os dois polieletrólitos, o pH da solução e as propriedades de viscosidade e textura dos biomateriais (AFZAL; MASWAL; DAR, 2018; DEVI; KAKATI, 2013). Dessa forma, as tentativas de replicar as condições descritas em estudos prévios não levaram à obtenção de um sistema de coacervado, mas revelaram alternativas que foram experimentalmente aprimoradas, particularmente o sistema de polímero de alginato de sódio-gelatina. Por exemplo, Devi e Kakati (2013) desenvolveram um complexo eletrolítico com os biopolímeros

alginate de sódio e gelatina tipo A com a proporção 1:3,5 em um pH de 3,75 baseada em análises de viscosidade relativa e turbidez do sistema. Essa condição replicada no presente estudo usando gelatina tipo A e alginato (ALG.387) com ajuste de pH para 3,7 com HCl, impediu o processo de complexação e foi observado um aumento excessivo da viscosidade no sistema. Este fenômeno de aumento de viscosidade pelo alginato também foi observado por Afzal, Maswal e Dar (2018), que relataram que o alginato de sódio em valores baixos de pH reforça sua viscosidade devido à protonação de íons carboxila, causando a supressão de repulsões eletrostáticas. Além disso, Yang, Chen e Fang (2009) observaram aumentos pronunciados na viscosidade do alginato de sódio em solução ao reduzir o pH de 4,0 para 3,0 com a adição de HCl.

Ainda, a mudança de um acidificante mais forte (ácido clorídrico) para um mais fraco (ácido acético) dentro do sistema de coacervação de alginato-gelatina A (ALG.387-GEa) para ajustar o sistema a um pH de 4,25 permitiu a formação de coacervados, mas com tamanhos superiores a 500 µm e com morfologias sem circularidade. Esse fenômeno foi observado por Saravanan e Rao (2010) em contraste com os estudos anteriores de Joseph e Venkataram (1995) e Shinde e Nagarsenker (2009), que usaram HCl para ajustar o sistema e obter uma coacervação complexa entre alginato e gelatina. Os autores levantam a hipótese de que a adição de um ácido tão forte quanto o HCl ao sistema pode causar a precipitação do ácido algínico, que é insolúvel em água, impedindo a formação de complexos com a gelatina Saravanan e Rao (2010). Os autores também expressaram que a fonte e as características intrínsecas do biopolímero usado (gelatina e alginato) são um fator relevante para a coacervação (SARAVANAN; RAO, 2010). Shinde e Nagarsenker (2009) identificaram as condições ideais de coacervação por meio da análise da viscosidade absoluta do sistema, o par de polímeros gelatina tipo B de grau bacteriológico e alginato de sódio de grau farmacêutico em uma proporção de 1:4 com um pH ideal de 3,5 usando ácido clorídrico. Por isso, neste estudo, a fim de melhorar o tamanho e a morfologia das partículas, um alginato menos viscoso (ALG.300) e a gelatina tipo B (GEb) foram experimentados em uma proporção de 1:4,5, obtendo-se partículas com diâmetro menor e morfologia mais definida, mas a partir de um pH de 4,25, quando inicialmente foi projetado para um pH 4,0.

Considerando as diferenças de cada sistema relatado na literatura, foi necessário determinar o potencial zeta dos biopolímeros usados para determinar a interação eletrostática entre os biopolímeros de gelatina-alginato e, dessa forma, determinar a

proporção dos biopolímeros e a janela de pH em que o sistema atinge a neutralidade de cargas. Ambos os alginatos testados apresentaram comportamento aniônico dentro da faixa de pH testada. O potencial zeta negativo do alginato é justificado pelo fato de que esse composto apresenta grupos carboxila (COO⁻) carregados negativamente nos blocos D-manurônico e L-gulurônico, que têm valores de pKa em torno de 3,5 e, portanto, são dissociados na solução. de alginato sem ajuste de pH (~ 6,0) (BAJPAI; TANKHIWALE, 2006). A solução de alginato de sódio com maior viscosidade (ALG.387) apresentou um potencial zeta (ζ) de -79,6 mV em um pH nativo de 6,7, carga superior ao alginato com viscosidade média (ALG. 300) em seu pH natural 5,62 com um ζ de -66,57 mV, valor muito próximo (ζ de -66,7 mV no pH de 7,0), ao obtido por (BERALDO, 2016) na produção de micropartículas de alginato cobertas com gelatina e colágeno com diferentes graus de hidrólise. Dessa forma, a produção de micropartículas à base de alginato e gelatina se mostra mais viável quando se utiliza alginato com menor grau de viscosidade em solução. Além disso, a densidade de carga da gelatina tipo B foi similar (10 mV) ao que foi relatado por Gonçalves (2016) (12 mV), o que permitiu determinar o ajuste adequado para o sistema baseado nos valores de densidade de carga. Foi assim que, neste estudo, foi determinada a condição ideal de alginato-gelatina tipo B (ALG.300-GEb) em uma proporção de 1:5 em um pH de 4,0 usando ácido acético glacial como acidificante (5% v/v) com uma temperatura relativamente constante de 45 °C.

A caracterização físico-química das emulsões formadoras de filme produzidas com fécula de mandioca revelou alguns padrões semelhantes aos relatados em estudos prévios (PERALTA-RUIZ *et al.*, 2020; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2010). A densidade dos revestimentos diminuiu com óleo essencial semelhante ao relatado por Peralta-Ruiz *et al.*, (2020) e Sánchez-González *et al.*, (2010) que elaboraram revestimentos à base de quitosana. As emulsões se mostraram ácidas entre 4,10 e 4,70, o que poderia contribuir para a inibição de fungos filamentosos por estarem fora da faixa de pH ideal para o crescimento de fungos. Da mesma forma, conforme relatado anteriormente, a viscosidade aparente das soluções de EFF foi reduzida com a adição OECC com um valor mais baixo quando o óleo essencial não foi encapsulado. Em contraste com os revestimentos à base de quitosana produzidos por Peralta-Ruiz *et al.* (2020), os revestimentos usados para revestir tomates no presente estudo apresentaram tamanhos de gotículas superiores a 30 μ m, o que pode ser devido ao

uso de homogeneização de alta pressão que não foi realizada a diferença dos autores devido à fraca adesão que ocasionava nos revestimentos.

Considerando que o tomate é um fruto bastante suscetível à deterioração por fungos (MEENA *et al.*, 2016), devido ao seu endocarpo macio e aos altos níveis de água (RIZWANA *et al.*, 2021), o revestimento biodegradável dos frutos tem sido visto como uma alternativa viável para prevenir sua perda (PERALTA-RUIZ *et al.*, 2020). Isso porque, a infecção de *A. alternata* em tomates pode ocorrer durante o armazenamento a frio ou durante o transporte, gerando o aparecimento de manchas pretas que impedem sua comercialização e consumo (RIZWANA *et al.*, 2021). O estudo de Peralta-Ruiz *et al.*, (2020) relata que o revestimento de quitosana e o óleo essencial de *Ruta graveolens* (a 1 e 1,5%) impediram o apodrecimento de tomates "Chonto" baseados em resultados de observação visual e apoiados pela não identificação de unidades formadoras de colônias de fungos. após 12 d de armazenamento em baixas temperaturas de armazenamento. No entanto, ao contrário de Peralta-Ruiz *et al.* (2020), o presente estudo identificou que o revestimento de tomates com emulsões formadoras de filme (EFF) à base de fécula de mandioca com óleo essencial de *C. citratus* livre e a EFF contendo micropartículas sem óleo não tiveram atividade sobre o patógeno, pois não foram favoráveis para proteger os frutos da ação patogênica induzida com base nos altos valores da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Ao contrário do estudo mencionado anteriormente, no presente estudo foi induzida a contaminação artificial do patógeno *A. alternata*, permitindo sua infecção nos frutos pela ferida feita assepticamente como entrada direta de infecção. Essa diferença também pode ser resultado do armazenamento dos tomates em temperatura ambiente (25 °C), ao contrário do estudo de Peralta-Ruiz *et al.* (2020), que armazenaram os frutos a 14 °C, o que poderia impedir que o óleo essencial evaporasse facilmente e que o fungo o assimilasse para seu crescimento. Somente o revestimento que continha o óleo essencial encapsulado em micropartículas coacervadas foi eficaz de impedir o avanço necrótico do patógeno e de cicatrizar o tecido lesionado pelo patógeno nos tomates. As concentrações inibitórias (CIM) do óleo essencial promissor em sua forma livre sobre os conídios do patógeno mostraram ser um excelente guia para manter um resultado antifúngico favorável usando frutas, de modo que o desenvolvimento de micropartículas em concentrações fungicidas (CFM) do derivado da planta possivelmente promete um resultado mais aprimorado. Esses resultados são promissores, considerando o trabalho de Qin *et al.* (2022), que relataram que o diâmetro

da lesão causada por *A. alternata* foi maior em tomates desprendidos da planta estando em condições de laboratório (43,44 mm) do que naqueles testados *in situ* na planta (33,63 mm).

Conseqüentemente, além de causar um impacto destrutivo na estrutura e na aparência do tomate que afeta sua comercialização, a infecção por *A. alternata* pode reduzir os níveis de componentes nutricionais importantes do tomate. Por exemplo, Tiwari e Upadhyay (2016) relataram que o conteúdo de licopeno e carotenoides totais apresentou uma redução colossal após 96 h de infecção por *A. alternata* em tomates, com valores de diminuição acima de 85 e 70%, respectivamente. Considerando que *A. alternata* entra no tecido do fruto por meio de feridas ou aberturas naturais, os conídios do patógeno pode permanecer inativos por vários dias e, posteriormente, sua afetação no fruto será observado visualmente (RIZWANA *et al.*, 2021), no qual seu controle desde o primeiro momento de pós-colheita é imperativo. Por exemplo, Li *et al.* (2018) identificaram que a *A. alternata* causa alterações químicas na manga após 3 d de incubação do patógeno e somente após 5 d começaram a ser observadas manchas necróticas na fruta. Além disso, Meena *et al.* (2016), destacam que o fungo necrotrófico de estudo, para atingir sua patogênese, desencadeia a produção de uma série de toxinas de tipo alternariol, entre elas, alternariol (AOH), éter monometílico de alternariol (AME), altenueno (ALT), tentoxina (TEN) e o ácido tenuazônico (TeA). Qin *et al.* (2022) identificaram picos elevados na produção de ácido tenuazônico (TeA) e alternariol (AOH) ($< 35.000 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $< 2 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente) após 9 d depois de inocular tomates no campo com 15 μL da suspensão de *A. alternata* (1×10^5 conídios mL^{-1}). Dessa forma, é necessário evitar a contaminação dos frutos com tecnologias de proteção baseadas em derivados de plantas promissoras como o OECc, e assim evitar o impacto estrutural e nutricional do fruto e evitar a produção de micotoxinas que contaminam os alimentos processados e podem afetar a saúde do consumidor final. Essa capacidade de produção de micotoxinas deve ser testada em condições *in vitro* nas frutas por meio da aplicação de revestimentos contendo micropartículas de alginato.300-gelatina tipo B encapsulando o óleo OECc.

Ao contrário, as variações na perda de peso dos frutos, na textura por punção e nas mudanças no pH, nos teores de sólidos totais e na acidez da polpa dos frutos não levaram a uma tendência ou diferenciação acentuada entre os diferentes grupos revestidos em relação ao grupo não revestido. No entanto, o grupo de tomates não tratados apresentou um índice de maturação significativamente diferente entre o revestimento contendo partículas de

0,50% OECc, óleo livre e o revestimento com partículas sem óleo. O efeito reduzido dos revestimentos sobre o metabolismo dos tomates pode ser devido ao fato de que o amido de mandioca é relatado como suscetível à umidade e tem uma baixa capacidade de barreira contra o vapor de água (CAMATARI *et al.*, 2018), portanto, a camada formada não interferiu na troca gasosa normal dos frutos. De forma semelhante a este estudo, Ambarsari, Oktaningrum e Endrasari (2018) relataram que o revestimento de amido de mandioca incorporando ácido cítrico não afetou a perda de peso, a cor, o caroteno e o teor de vitamina C dos tomates da variedade Martha, possivelmente devido às baixas concentrações de amido usadas (1 a 3% p/v). Os resultados físico-químicos apresentam uma série de discrepâncias que podem ser produto da heterogeneidade das amostras independentes, embora tenham sido adquiridas nas mesmas instalações comerciais e tenham apresentado características visualmente semelhantes durante sua seleção e agrupamento, elas podem apresentar diferenças intrínsecas devido às condições pedológicas, climáticas e técnicas de diferentes culturas (Peralta-Ruiz *et al.*, 2020). No entanto, os revestimentos que serviram de matriz de carga para as micropartículas bioativas ou o óleo livre não afetaram negativamente o processo de maturação. Portanto, investigar seu efeito com a adição de outros biopolímeros, como a quitosana, aumentando o período de armazenamento e as temperaturas, poderia otimizar o efeito dos revestimentos para a proteção das frutas (CAMATARI *et al.*, 2018; PERALTA-RUIZ *et al.*, 2020).

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

9.1. CONCLUSÕES DO ESTUDO 1

O *Estudo 1* avaliou o efeito da forma livre e emulsificada dos óleos essenciais de *Annona acutiflora*, *Xylopiya ochrantha*, *Cymbopogon citratus* e cinamaldeído sobre o desenvolvimento de conídios do fungo *Thielaviopsis ethacetica*, bem como seu efeito sobre a carga micótica e os parâmetros físico-químicos da banana ouro durante o armazenamento. O potencial fungistático detectado nos óleos essenciais de *A. acutiflora* e *X. ochrantha* sobre *T. ethacetica* não foi totalmente promissor quando se comparou sua atividade com o óleo essencial de *C. citratus*, um derivado com atividade fúngica relatado anteriormente. A caracterização química dos dois óleos essenciais de espécies endêmicas do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba que foram menos eficientes mostra uma predominância de sesquiterpenos hidrocarbonados em comparação com a riqueza de monoterpenos oxigenados presentes no óleo essencial de *C. citratus*. Esse fato abre a possibilidade de testar derivados de plantas ricos nessa classe de compostos oxigenados para desenvolver bioprodutos mais eficazes contra o patógeno da podridão negra em frutas como a banana.

Por outro lado, a formulação de nanoemulsão de baixa energia relatada na literatura para os óleos essenciais de *A. acutiflora* e *X. ochrantha* mostrou-se viável, pois foram elaboradas nanoemulsões com estabilidade cinética considerando tamanhos de gotículas inferiores a 200 nm e índice de polidispersividade inferior a 0,3. Do ponto de vista microbiológico, as nanoemulsões desses derivados não apresentaram resultados promissores na inibição do conídio de *T. ethacetica*. Por isso foi necessário repensar a estratégia de inibição desse patógeno de difícil controle no campo.

A combinação do óleo essencial de *A. acutiflora* com cinamaldeído, um aldeído reconhecido com propriedades antimicrobianas foi favorável para a inibição do patógeno em sua forma conidial, mas seu efeito não foi potencializado como inicialmente esperado. Além disso, apenas o cinamaldeído em sua forma pura foi capaz de inibir o desenvolvimento micelial do patógeno estudado, enquanto as nanoemulsões de cinamaldeído ou a combinada com o óleo de *A. acutiflora* apenas retardaram sua disseminação na placa. Esse fenômeno, somado ao que foi observado com o óleo de *C. citratus*, que foi favorável contra os conídios de *T. ethacetica*, mas inativo no desenvolvimento micelial do patógeno,

demonstra que há uma especificidade na atividade antifúngica dos derivados de plantas. Portanto, é possível que seja arriscado informar os valores de CIM considerando os resultados de um único método de suscetibilidade (difusão, micelial e microdiluição), conforme observado na literatura atual. Esse fenômeno requer estudos aprofundados que revelem características intrínsecas em nível celular sobre o efeito de derivados de plantas que são substâncias promissoras para o controle de patógenos na forma conidial e micelial.

As emulsões preparadas a partir do cinamaldeído ou em combinação com *A. acutiflora* reduziram a carga fúngica presente nas bananas armazenadas, o que representa um efeito positivo que poderia abrir caminhos para o desenvolvimento de bioprodutos com base nesses derivados de plantas. De acordo com a análise instrumental de cor, textura, da casca, bem como variações de pH, sólidos totais e acidez da polpa das bananas tratadas com as emulsões bioativas, estas não produziram efeito negativo sobre a vida útil de prateleira dos frutos e não foram observados danos mecânicos ou biológicos nas amostras analisadas. Dessa forma, a incorporação dessas emulsões em matrizes como revestimentos à base de biopolímeros parece ser uma ferramenta promissora para aumentar o efeito antifúngico dos derivados em frutas tão degradadas como a banana.

9.2. PERSPECTIVAS DO ESTUDO 1

Considerando as limitações experimentais e as propostas de aprimoramento dos resultados do Estudo 1, são propostas as seguintes perspectivas de estudo.

- Elaborar uma formulação pelo método de baixa energia para nanoemulsionar o cinamaldeído e o óleo essencial de *A. acutiflora*.
- Comparar o efeito antifúngico das nanoemulsões de cinamaldeído de baixa e alta energia sobre *Thielaviopsis ethacetica* e outros fungos envolvidos no complexo degradador da banana.
- Avaliar, por meio de ensaios bioquímicos e análise morfológica, o mecanismo de ação das emulsões de cinamaldeído e os óleos essenciais de espécies endêmicas sobre *Thielaviopsis ethacetica*.

- Propor uma formulação de revestimento de biopolímeros eficientes e pouco explorados para incorporar nanoemulsões à base de cinamaldeído a serem aplicadas em bananas ou outras frutas afetadas por fungos fitopatógenos.
- Ampliar a bateria de testes físicos e físico-químicos para monitorar a qualidade dos frutos revestidos com as soluções propostas.
- Desenvolver ensaios ecotoxicológicos e de citotoxicidade destes derivados vegetais para avaliar sua segurança no meio ambiente.

9.3. CONCLUSÕES DO ESTUDO 2

O tomate é um dos alimentos agrícolas com alto valor nutritivo cultivado em diferentes regiões do mundo, mas que, por sua vez, é altamente afetado em sua fase pós-colheita por fungos degradadores, entre os quais se destaca a *Alternaria alternata*. Dessa forma, o presente estudo buscou avaliar o efeito antifúngico in vitro e in situ do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* para o controle do patógeno *A. alternata* tanto em testes de suscetibilidade em placas quanto em tomate por meio de um teste de contaminação artificial. Para isso, neste estudo visou encapsular o promissor óleo essencial pela técnica de coacervação complexa para evitar sua degradação e formulou-se uma matriz do tipo revestimento para sua aplicação em frutos de tomate, a fim de avaliar seu efeito antifúngico e sobre a vida útil dos frutos armazenados.

Inicialmente, a caracterização química do óleo essencial revelou que o fungo *A. alternata* foi exposto a 3 compostos principais, neral, geranial e mirceno, identificando um padrão semelhante em derivados da mesma planta no território brasileiro por meio da revisão da literatura. Em seguida, foram determinadas as condições ideais para a microencapsulação do óleo essencial por meio da realização de estudos prévios, mas foi o estudo detalhado da distribuição de cargas por meio do potencial zeta de cada polímero que permitiu determinar o par ideal de polímeros de alginato.300-gelatina tipo B (ALG.300-GEb) em uma proporção de 1:5 em um pH de 4,0 usando ácido acético glacial como acidificante (5% v/v) a uma temperatura relativamente constante de 45 °C para coacervação e um período de decantação em um banho frio a 14 °C por 16 h. Dessa forma, pode-se verificar que a densidade de carga de cada biopolímero, o pH de coacervação, a proporção de biopolímero, o acidificante usado e a viscosidade do biomaterial da parede influenciam

drasticamente o complexo processo de coacervação. No sistema foi observado um rendimento de coacervação acima de 50% nas duas micropartículas sob o sistema mais estável, ao contrário do sistema alginato-gelatina b 1:4,5, que obteve um rendimento de 27,4% do processo. No entanto, a perda de derivados de plantas, bem como os rendimentos de complexação, foram observados no sistema ideal deste estudo, de modo que a adição de um novo surfactante e acidificante poderia ser uma estratégia de melhoria. No entanto, os diferentes ajustes feitos em termos de material de parede, pH e proporções permitiram a obtenção de partículas com diâmetros e distribuição menores e mais aceitáveis, bem como uma morfologia mais circular. As micropartículas geradas tinham um diâmetro inferior a 100 µm com uma distribuição inferior a 1,2. A presença do óleo essencial e do componente principal citral foi verificada por testes de espectrometria e por cromatografia gasosa.

O encapsulamento do óleo essencial em micropartículas coacervadas favoreceu a atividade fungistática e fungicida *in vitro* do derivado da planta sobre o patógeno. Foram determinados CIM e CFM de 0,125% e 0,50% (v/v) para o óleo OECC livre em *A. alternata*, enquanto a forma encapsulada demonstrou atividade fungistática e fungicida em concentrações mais baixas com valores de CIM e CFM de 0,03125. % e 0,0625%, respectivamente.

A partir de pré-testes, foi possível formular emulsões formadoras de filme à base de fécula de mandioca, glicerol, Tween 80 e o derivado vegetal bioativo que permitiu revestir e aderir completamente à fruta com base na coloração com iodo. Em contraste com o tamanho da gota, a densidade relativa e a viscosidade aparente das emulsões formadoras de filme estavam dentro da faixa descrita por outros autores que prepararam formulações à base de quitosana.

Com base no teste de avaliação antifúngica *in situ*, estimulando a infecção por *Alternaria alternata* em tomates sob condições controladas de temperatura e umidade, identificou-se que os revestimentos de amido de mandioca contendo micropartículas com o óleo OECC a 0,50 e 0,25% impediram o desenvolvimento necrótico de *A. alternata* e geraram um efeito de cura na ferida criada artificialmente nos tomates. Em contraste, o revestimento à base de óleo essencial livre (0,25%) e o revestimento com partículas sem óleo estimularam o fungo levando a geração de danos necróticos externos e internos ao tomate, um efeito muito menor nos tomates não revestidos que não apresentavam uma

fonte de carbono adicional (amido de mandioca). Portanto, a adição de um biopolímero, como a quitosana, com atividade antifúngica intrínseca, possibilitou aumentar o efeito dos revestimentos nos frutos.

Já a bateria de testes físico-químicos nos tomates revestidos e armazenados por 9 dias a uma temperatura de 25 °C revelou que o revestimento à base de fécula de mandioca não alterou nem gerou tendência de diferença entre esses e os frutos não revestidos em relação à perda de peso, textura, pH, sólidos solúveis totais e acidez total da polpa do fruto. Entretanto, devido a aspectos da relação das coordenadas cromáticas a^*/b^* , os frutos não revestidos aos 9 dias de incubação apresentaram a coloração adequada para comercialização, enquanto para os frutos revestidos essa coloração foi ligeiramente retardada. Além disso, com base na relação entre o conteúdo de sólidos solúveis totais e a acidez total, foi demonstrado que os frutos do controle apresentaram um índice de amadurecimento significativamente maior do que os grupos revestidos pelas soluções formadoras de filme formuladas no presente estudo. Portanto, isso revela o potencial dos revestimentos para melhorar a qualidade da vida útil dos frutos, além de seu potencial antimicrobiano que impede sua degradação por fungos devastadores, como *A. alternata*.

9.4. PERSPECTIVAS DO ESTUDO 2

As seguintes propostas de estudo poderiam ser realizadas a partir desta tese a fim de aprimorar os resultados obtidos.

- Avaliar o efeito sobre a morfologia microscópica do fungo *A. alternata* e outros envolvidos no complexo de infecção em tomates para determinar os mecanismos de ação do óleo essencial promissor.
- Realizar um estudo utilizando a ferramenta design de experimentos (DOE) de forma a melhorar o desempenho do conservante com polímeros existentes ou novos.
- Determinar a eficiência do encapsulamento de forma quantitativa e demonstrar quais fatores físico-químicos têm o maior efeito no processo de encapsulamento.
- Testar a capacidade fúngica do óleo essencial promissor em outros patógenos envolvidos no complexo de infecção do tomate na fase pós-colheita.

- Implementar estudos sobre a combinação de biopolímeros para a formulação de revestimentos que sejam mais difíceis de serem degradados por fungos.
- Avaliar o efeito do óleo essencial promissor sobre o efeito da produção de micotoxinas por *A. alternata* em condições *in vitro* e em frutos.
- Avaliar a ecotoxicidade e a citotoxicidade das micropartículas e dos revestimentos produzidos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MOTAAL, F.; KAMEL, N.; EL-ZAYAT, S.; ABOU-ELLAIL, M. Early blight suppression and plant growth promotion potential of the endophyte *Aspergillus flavus* in tomato plant. **Annals of Agricultural Sciences**, vol. 65, no. 2, p. 117–123, Dec. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2020.07.001>.

ABREU, F. O. M. S.; OLIVEIRA, E. F.; PAULA, H. C. B.; DE PAULA, R. C. M. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, vol. 89, no. 4, p. 1277–1282, 1 Aug. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.048>.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry**. Illinois, USA: Allured Publishing Corporation, 2007.

ADHIKARI, P.; OH, Y.; PANTHEE, D. Current status of early blight resistance in tomato: an update. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 18, no. 10, p. 2019, 21 Sep. 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18102019>.

AFZAL, S.; MASWAL, M.; DAR, A. A. Rheological behavior of pH responsive composite hydrogels of chitosan and alginate: Characterization and its use in encapsulation of citral. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 169, p. 99–106, Sep. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.05.002>

ALBUQUERQUE, R. D. D. G. **Estudo fitoquímico e biológico de folhas da espécie vegetal *Xylopiá ochranta* (Mart.)**. 2013. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos para a Saúde) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2013.

ALMEIDA, F.; RODRIGUES, M. L.; COELHO, C. The still underestimated problem of fungal diseases worldwide. **Frontiers in Microbiology**, vol. 10, no. FEB, 12 Feb. 2019. DOI 10.3389/fmicb.2019.00214. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00214/full>.

ÁLVAREZ, M. R.; MELÉNDEZ, L. A.; COSÍO, S. M. R. **Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas**. La Paz, Baja California Sur, México: Edit. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., 2012. vol. 1.

ALVES, M. F.; NIZIO, D. A. de C.; SAMPAIO, T. S.; NASCIMENTO, A. F. do; BRITO, F. de A.; MELO, J. O. de; ARRIGONI-BLANK, M. de F.; GAGLIARDI, P. R.; MACHADO, S. M. F.; BLANK, A. F. *Myrcia lundiana* Kiaersk native populations have different essential oil composition and antifungal activity against *Lasiodiplodia theobromae*. **Industrial Crops and Products**, vol. 85, p. 266–273, Jul. 2016. DOI 10.1016/j.indcrop.2016.03.039. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.039>.

AMBARSARI, I.; OKTANINGRUM, G. N.; ENDRASARI, R. Effectiveness of incorporating citric acid in cassava starch edible coatings to preserve quality of Martha tomatoes. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, vol. 102, p. 012073, Jan. 2018. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/102/1/012073>.

AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia**. 4th ed. São Paulo: São Paulo: Agronômica Ceres, 2011.

ANARJAN, N.; JABERI, N.; YEGANEH-ZARE, S.; BANAFSHEHCHIN, E.; RAHIMIRAD, A.; JAFARIZADEH-MALMIRI, H. Optimization of mixing parameters for α -tocopherol nanodispersions prepared using solvent displacement method. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, vol. 91, no. 8, p. 1397–1405, 20 Aug. 2014. DOI 10.1007/s11746-014-2482-6. Available at: <https://aocs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1007/s11746-014-2482-6>.

ANTONIOLI, G.; FONTANELLA, G.; ECHEVERRIGARAY, S.; LONGARAY DELAMARE, A. P.; FERNANDES PAULETTI, G.; BARCELLOS, T. Poly(lactic acid) nanocapsules containing lemongrass essential oil for postharvest decay control: *In vitro* and *in vivo* evaluation against phytopathogenic fungi. **Food Chemistry**, vol. 326, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126997>.

ARAÚJO, F. de P.; ALBUQUERQUE, R. D. D. G. de; RANGEL, L. da S.; CALDAS, G. R.; TIETBOHL, L. A. C.; SANTOS, M. G.; RICCI-JÚNIOR, E.; THIENGO, S.; FERNANDEZ, M. A.; SANTOS, J. A. A. dos; FARIA, R. X.; ROCHA, L. Nanoemulsion containing essential oil from *Xylopia ochrantha* Mart. produces molluscicidal effects against different species of Biomphalaria (*Schistosoma hosts*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 114, 2019. DOI 10.1590/0074-02760180489. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762019000100318&tIng=en.

ARCELLA, D.; ESKOLA, M.; GÓMEZ RUIZ, J. A. Dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population. **EFSA Journal**, vol. 14, no. 12, Dec. 2016. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4654>.

ARCILA, P., M I. **Poscosecha, industrialización y uso de subproductos del plátano “Módulo IX, Corpoica regional nueve**, Armenia, Colombia: Corporación colombiana de investigación agropecuaria – AGROSAVIA, 2002 <http://hdl.handle.net/20.500.12324/16734>.

ASBAHANI, A. El; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; ADDI, E. H. A.; CASABIANCA, H.; MOUSADIK, A. El; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAISSARI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 483, no. 1–2, p. 220–243, 15 Apr. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>.

AUNG, S. L. L.; LIU, H. F.; PEI, D. F.; LU, B. Bin; OO, M. M.; DENG, J. X. Morphology and molecular characterization of a fungus from the *Alternaria alternata* species complex

causing black spots on *Pyrus sinkiangensis* (Koerle pear). **Mycobiology**, vol. 48, no. 3, p. 233–239, 3 May 2020. <https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1745476>.

BADR, M. M.; BADAWEY, M. E. I.; TAKTAK, N. E. M. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of cinnamon essential oil and cinnamaldehyde nanoemulsions. **Journal of Essential Oil Research**, vol. 34, no. 6, p. 544–558, 2 Nov. 2022. DOI 10.1080/10412905.2022.2107100. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10412905.2022.2107100>.

BAJPAL, S. K.; TANKHIWALE, R. Investigation of water uptake behavior and stability of calcium alginate/chitosan bi-polymeric beads: Part-1. **Reactive and Functional Polymers**, vol. 66, no. 6, p. 645–658, Jun. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2005.10.017>.

BANGYEKAN, C.; AHT-ONG, D.; SRIKULKIT, K. Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films. **Carbohydrate Polymers**, vol. 63, no. 1, p. 61–71, Jan. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.07.032>.

BARBOSA, L.; PEREIRA, U.; MARTINAZZO, A.; MALTHA, C.; TEIXEIRA, R.; MELO, E. Evaluation of the Chemical Composition of Brazilian Commercial *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf Samples. **Molecules**, vol. 13, no. 8, p. 1864–1874, 27 Aug. 2008. DOI 10.3390/molecules13081864. Available at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/13/8/1864>.

BATISTA, D. de V. S.; REIS, R. C.; ALMEIDA, J. M.; REZENDE, B.; BRAGANÇA, C. A. D.; DA SILVA, F. Edible coatings in post-harvest papaya: impact on physical–chemical and sensory characteristics. **Journal of Food Science and Technology**, vol. 57, no. 1, p. 274–281, 29 Jan. 2020. DOI 10.1007/s13197-019-04057-1. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-019-04057-1>.

BERALDO, J. **Produção de micropartículas de alginato tendo como cobertura gelatina e colágeno com diferentes graus de hidrólise**. 2016. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição na Área de Nutrição Experimental Aplicada a Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2016. <https://doi.org/10.47749/T/UNICAMP.2016.972029>.

BERTUZZI, T.; RASTELLI, S.; PIETRI, A.; GIORNI, P. *Alternaria* toxins in tomato products in Northern Italy in the period 2017-2019. **Food Additives & Contaminants: Part B**, vol. 14, no. 3, p. 170–176, 3 Jul. 2021. <https://doi.org/10.1080/19393210.2021.1895325>.

BICO, S. L. S.; RAPOSO, M. F. J.; MORAIS, R. M. S. C.; MORAIS, A. M. M. B. Combined effects of chemical dip and/or carrageenan coating and/or controlled atmosphere on quality of fresh-cut banana. **Food Control**, vol. 20, no. 5, p. 508–514, May 2009. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.07.017>.

BLANCO, M. M.; COSTA, C. A. R. A.; FREIRE, A. O.; SANTOS, J. G.; COSTA, M. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. **Phytomedicine**, vol. 16, no. 2–3, p. 265–270, Mar. 2009. DOI 10.1016/j.phymed.2007.04.007. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711307000712>.

BORGES, A. F.; DE ALCÂNTARA NETO, F.; DA SILVA MATOS, K.; JÚNIOR, J. E. A. B.; JÚNIOR, N. S. M.; MOREIRA, S. I.; DE MELO, M. P. *Thielaviopsis ethacetica* the etiological agent of sugarcane pineapple sett rot disease in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, vol. 44, no. 5, p. 460–467, 15 Aug. 2019. <https://doi.org/10.1007/s40858-019-00298-9>.

BORGES, A. L.; DA SILVA, A.; BATISTA, da C.; MOREIRA, F. R.; FLORI, J. E.; OLIVEIRA, J. E.; PINTO, J. M.; ARAÚJO, J. L.; CUNHA E CASTRO, J. M.; DE MOURA, M. S.; AZOUBEL, P. M.; CUNHA, T. J. F.; OLIVEIRA E SILVA, S.; CORDEIRO, Z. J. M. **Sistema de produção da bananeira irrigada**. Sistemas de produção. [S. l.]: EMBRAPA, 2009. vol. 1.

BRASILEIRO, J. S. L. **Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas**. 2011. 40–60 f. Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011. Available at: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/2457/3/TM_15548.pdf. Accessed on: 15 Jan. 2024.

CAMATARI, F. O. dos S.; SANTANA, L. C. L. de A.; CARNELOSSI, M. A. G.; ALEXANDRE, A. P. S.; NUNES, M. L.; GOULART, M. O. F.; NARAIN, N.; SILVA, M. A. A. P. da. Impact of edible coatings based on cassava starch and chitosan on the post-harvest shelf life of mango (*Mangifera indica*) ‘Tommy Atkins’ fruits. **Food Science and Technology**, vol. 38, no. suppl 1, p. 86–95, Dec. 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.16417>.

CAMPOLO, O.; GIUNTI, G.; LAIGLE, M.; MICHEL, T.; PALMERI, V. Essential oil-based nano-emulsions: Effect of different surfactants, sonication and plant species on physicochemical characteristics. **Industrial Crops and Products**, vol. 157, p. 112935, 1 Dec. 2020. DOI 10.1016/j.indcrop.2020.112935. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669020308529>.

CARBAJAL, D.; CASACO, A.; ARRUZAZABALA, L.; GONZALEZ, R.; TOLON, Z. **Pharmacological study of *Cymbopogon citratus* leaves**. [S. l.: s. n.], 1989.

CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, LIA GIRALDO DA SILVA RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro / São Paulo: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio Fundação Oswaldo Cruz - Expressão Popular, 2015. Available at: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/26221>. Accessed on: 29 Sep. 2019.

CARVALHO, R. R.; LARANJEIRA, D.; DE CARVALHO FILHO, J. L. S.; DE SOUZA, P. E.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; DE JESUS, H. C. R.; WARWICK, D. R. N. *In vitro* activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis*

paradoxa, causal agent of stem bleeding in coconut palms. **Quimica Nova**, vol. 36, no. 2, p. 241–244, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000200007>.

CASTRICINI, A.; MEDEIROS, S. F. de.; CONEGLIAN, R. C.; VITAL, H. D. C. Qualidade nutricional e antioxidante do tomate “tipo italiano”. **Alim. Nutr., Araraquara.**, vol. 19, no. 1, p. 25–31, 2004.

CASTRO, V. A. S. P. T. **Controle do amadurecimento pós-colheita do tomate ‘Carmem’ tratado com ácido 2-cloroetil fosfônico**. 2003. 1–88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CHAMBI, H. N. M. Desenvolvimento de filmes a partir de caseína e gelatina modificadas enzimaticamente com tripsina e transglutaminase. 1-7 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004. <https://doi.org/10.47749/T/UNICAMP.2004.315082>.

CHIUMARELLI, M. **Aplicação de coberturas comestíveis à base de fécula de mandioca e cera de carnaúba em maçãs minimamente processadas**. 2011. 1–281 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

CHRISTOPH, R.; SCHMIDT, B.; STEINBERNER, U.; DILLA, W.; KARINEN, R. Glycerol. **Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry**. 5th ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. https://doi.org/10.1002/14356007.a12_477.pub2.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard—CLSI document M38-A2**. 2nd ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. vol. 22.

COSTA, A. R. T.; AMARAL, M. F. Z. J.; MARTINS, P. M.; PAULA, J. R. J. A. M.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R. J. A. M.; BARA, M. T. F.; FERREIRA, F. M. D. F. D. D.; MOSSINI, S. A. G.; FERREIRA, F. M. D. F. D. D.; ARROTÉIA, C. C.; DA COSTA, C. L.; NAKAMURA, C. V.; MACHINSKI JUNIOR, M.; FARIAS, A. P. P.; MONTEIRO, O. dos S.; DA SILVA, J. K. R.; FIGUEIREDO, P. L. B.; ... GONÇALVES, J. E. F. C. J. F. C. Chemical constituents of essential oil from *Murraya paniculata* leaves and its application to *in vitro* biological control of the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol. 10, no. 2, p. 1–4, 1 Jul. 2020. DOI 10.1590/1983-084X/12_115. Available at: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1934578X1601100945>.

COTTRELL, I. W.; BAIRD, J. K. Gums. *In*: KIRK, R. E.; OTHMER, D. F.; (eds.). **Encyclopedia of Chemical Technology**. New York: John Wiley, 1980. vol. 12, p. 45–66.

CRUZ, E. M. O.; MENDONÇA, M. C.; BLANK, A. F.; SAMPAIO, T. S.; PINTO, J. A. O.; GAGLIARDI, P. R.; OLIVEIRA, L. F. G.; DE LIMA, R. S. N.; NUNES, R. S.; WARWICK, D. R. N. *Lippia gracilis* Schauer essential oil nanoformulation prototype for the control of *Thielaviopsis paradoxa*.

Industrial Crops and Products, vol. 117, p. 245–251, Jul. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.068>.

DAMALAS, C. A.; KOUTROUBAS, S. D. Botanical Pesticides for Eco-Friendly Pest Management. **Pesticides in Crop Production**. [S. l.]: Wiley, 2020. p. 181–193. <https://doi.org/10.1002/9781119432241.ch10>.

DAS, S.; GHOSH, A.; MUKHERJEE, A. Nanoencapsulation-based edible coating of essential oils as a novel green strategy against fungal spoilage, mycotoxin contamination, and quality deterioration of stored fruits: an overview. **Frontiers in Microbiology**, vol. 12, 26 Nov. 2021. DOI 10.3389/fmicb.2021.768414. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.768414/full>.

DAS, S. K.; VISHAKHA, K.; DAS, S.; GANGULI, A. Antibacterial and antibiofilm activities of nanoemulsion coating prepared by using caraway oil and chitosan prolongs the shelf life and quality of bananas. **Applied Food Research**, vol. 3, no. 1, p. 100300, Jun. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100300>.

DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; BARNES, I.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Redefining *Ceratocystis* and allied genera. **Studies in Mycology**, vol. 79, no. 1, p. 187–219, 1 Sep. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.001>. Accessed on: 27 Jul. 2020.

DE MELO, M. P.; DA SILVA MATOS, K.; JÚNIOR, J. E. A. B.; MOREIRA, S. I.; SILVA, F. F.; DE ALCÂNTARA NETO, F.; ALVES, E.; PEREIRA, O. L. *Thielaviopsis musarum* causes postharvest crown and fruit rot of banana in Northeastern Brazil. **Tropical Plant Pathology**, vol. 41, no. 4, p. 258–263, 1 Aug. 2016. <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0094-4>.

DE SOUZA FERREIRA, T. P.; RONICE, A. V.; GIL, R. dos S.; LAIZA, P. dos S.; TATIANI, P. de S. F.; ALESSANDRA, M. B.; RICHARD, D. P.; RAIMUNDO, W. de S. A. Enzymatic activity and elicitor of phytoalexins of *Lippia sidoides* Cham. and endophytic fungi. **African Journal of Biotechnology**, vol. 17, no. 15, p. 521–530, 11 Apr. 2018. DOI 10.5897/ajb2018.16402. Available at: <http://www.academicjournals.org/AJB>. Accessed on: 16 Mar. 2020.

DE SOUZA MOURA, W.; DE SOUZA, S. R.; CAMPOS, F. S.; SANDER RODRIGUES CANGUSSU, A.; MACEDO SOBRINHO SANTOS, E.; SILVA ANDRADE, B.; BORGES GOMES, C. H.; FERNANDES VIANA, K.; HADDI, K.; OLIVEIRA, E. E.; NASCIMENTO, V. L.; DE SOUZA AGUIAR, R. W. Antibacterial activity of *Siparuna guianensis* essential oil mediated by impairment of membrane permeability and replication of pathogenic bacteria. **Industrial Crops and Products**, vol. 146, p. 112142, 1 Apr. 2020. DOI 10.1016/j.indcrop.2020.112142. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669020300583>. Accessed on: 31 May 2020.

DÉLICES, G.; LEYVA, O.; MOTA-VARGAS, C.; NÚÑEZ, R.; GÁMEZ, R.; MEZA, P. A.; SERNALAGUNES, R. Biogeografía del tomate *Solanum lycopersicum* var. cerasiforme (Solanaceae)

en su centro de origen (sur de América) y de domesticación (México). **Revista de Biología Tropical**, vol. 67, no. 4, p. 1023–1036, 2019.

DEVI, N.; KAKATI, D. K. Smart porous microparticles based on gelatin/sodium alginate polyelectrolyte complex. **Journal of Food Engineering**, vol. 117, no. 2, p. 193–204, 2013a. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.02.018>.

DEVI, N.; SARMAH, M.; KHATUN, B.; MAJI, T. K. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. **Advances in Colloid and Interface Science**, vol. 239, p. 136–145, 1 Jan. 2017. DOI 10.1016/j.cis.2016.05.009. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868616300446>.

DHALL, R. K. Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 53, no. 5, p. 435–450, Jan. 2013. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.541568>.

DIMA, C.; COTÂRLET, M.; ALEXE, P.; DIMA, S. Microencapsulation of essential oil of pimento [*Pimenta dioica* (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex coacervation method. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, vol. 22, p. 203–211, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.12.020>.

DONSÌ, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, vol. 233, p. 106–120, Sep. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.005>.

DOS PASSOS BRAGA, S.; MAGNANI, M.; MADRUGA, M. S.; DE SOUZA GALVÃO, M.; DE MEDEIROS, L. L.; BATISTA, A. U. D.; DIAS, R. T. A.; FERNANDES, L. R.; DE MEDEIROS, E. S.; DE SOUZA, E. L. Characterization of edible coatings formulated with chitosan and *Mentha* essential oils and their use to preserve papaya (*Carica papaya* L.). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, vol. 65, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102472>.

DUARTE, J. A.; ALVES RIBEIRO DA SILVA, G.; MACHADO, F. P.; FOLLY, D.; PEÑALOZA, E.; GARRETT, R.; SANTOS, M. G.; VENTURA, J. A.; WERMELINGER, G. F.; ROBBS, B. K.; ROCHA, L.; FIAUX, S. B. Glimpsing the chemical composition and the potential of Myrtaceae plant extracts against the food spoilage fungus *Thielaviopsis ethacetica*. **Food Control**, vol. 146, p. 109501, Apr. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109501>.

DUARTE, J. A. D.; FIAUX, S. B.; BARBOSA, E.; TOLEDO, P. F. S.; SILVA, A. C. F.; OLIVEIRA, E. E.; LEITE, J. P. V.; SANTOS, M. G.; ROCHA, L. Antifungal potential and biosafety of native plants from the Brazilian Restinga ecosystem. **Cleaner Engineering and Technology**, vol. 8, p. 100493, Jun. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.clet.2022.100493>.

DUTTON, G. G. S. Polysaccharides. In: MARK, H. F.; KROSCWITZ, J. I. (eds.). **Encyclopedia of Polymer Science and Engineering**. New York: John Wiley, 1988. vol. 13, p. 87–146.

FABBRI, A. D. T. **Estudo da radiação ionizante em tomates *in natura* (*Lycopersicum esculentum* Mill) e no teor de licopeno do molho.** 2009. 1–85 f. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. <https://doi.org/10.11606/D.85.2009.tde-22092011-141423>.

FAGUNDES, C.; PÉREZ-GAGO, M. B.; MONTEIRO, A. R.; PALOU, L. Antifungal activity of food additives in vitro and as ingredients of hydroxypropyl methylcellulose-lipid edible coatings against *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 166, no. 3, p. 391–398, Sep. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.001>.

FANG, S.; FENG, X.; LEI, Y.; CHEN, Z.; YAN, L. Improvement of wood decay resistance with cinnamaldehyde chitosan emulsion. **Industrial Crops and Products**, vol. 160, 1 Feb. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113118>.

FAO. Bananas. 2024. **Markets and Trade - Basic Products**. Available at: <https://www.fao.org/markets-and-trade/commodities/bananas/es/>. Accessed on: 15 Jul. 2024.

FAO. **FAOSTAT - Crops and livestock products. Food and Agriculture Organization of the United Nations - Production Data.** [S. l.: s. n.], 2023.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C. de; ROCHA, G. A. Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, vol. 11, no. 2, p. 103–112, May 2008.

FENG, J.; SUN, L.; ZHAI, T.; LIANG, Q.; JIANG, T.; CHEN, Z. Preparation of cinnamaldehyde nanoemulsions: Formula optimization, antifungal activity, leaf adhesion, and safety assessment. **Industrial Crops and Products**, vol. 200, 15 Sep. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116825>.

FERNANDEZ, E.; NEGRÃO, R.; MORAES, L.; MARTINELLI, G.; GOMES, M. *Annona acutiflora*. 2021. **The IUCN Red List of Threatened Species 2021**. Available at: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK>. Accessed on: 6 Feb. 2022.

FILIPOV, A. **Medicinal plants of the Pilag& of Central Chaco.** [S. l.: s. n.], 1994.

FIRETTI, R.; MARTINS, A. N.; SUGUINO, E.; TURCO, P. H. N.; ARAÚJO, H. S. Multivariate analysis of vegetative growth and productivity in cultivars of the Cavendish subgroup of the banana. **REVISTA CIÊNCIA AGRONÔMICA**, vol. 55, 2024. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20230064>.

FISHER, M. C.; HENK, D. A.; BRIGGS, C. J.; BROWNSTEIN, J. S.; MADOFF, L. C.; MCCRAW, S. L.; GURR, S. J. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, vol. 484, no. 7393, p. 186–194, 12 Apr. 2012. <https://doi.org/10.1038/nature10947>.

FLORA DO BRASIL 2020. Flora do Brasil 2020 under construction. 2020. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Available at: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Accessed on: 6 Aug. 2020.

FOLLY, D.; MACHADO, F. P.; ESTEVES, R.; DUARTE, J. L.; CRUZ, R. A. S.; OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; FERREIRA, R. M. A.; SOUTO, R. N. P.; SANTOS, M. G.; CARVALHO, J. C. T.; RUPPELT, B. M.; FERNANDES, C. P.; ROCHA, L. Characterization of the essential oil from *Annona acutiflora* and its nanoemulsion for the *Aedes aegypti* control. **Journal of Essential Oil Research**, vol. 33, no. 6, p. 559–566, 2021. <https://doi.org/10.1080/10412905.2021.1966847>.

FRANÇA, K. R. da S.; DE MEDEIROS FERRO, M. M.; FEIJÓ, F. M.; CAVALCANTI DA SILVA, S. J.; DE MELO, M. P.; DE ANDRADE LIMA, G. S.; ASSUNÇÃO, I. P. First report of *Lasiodiplodia hormozganensis* and *Lasiodiplodia laeliocattleyae* causing crown rot disease in banana fruits in Brazil. **Crop Protection**, vol. 184, p. 106784, Oct. 2024. DOI 10.1016/j.cropro.2024.106784. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261219424002126>.

FRAZÃO, G. G. S.; BLANK, A. F.; DE AQUINO SANTANA, L. C. L. Optimisation of edible chitosan coatings formulations incorporating *Myrcia ovata* Cambessedes essential oil with antimicrobial potential against foodborne bacteria and natural microflora of mangaba fruits. **LWT-Food Science and Technology**, vol. 79, p. 1-10, jun. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.011>

FURLAN, M. R.; MARTINS, R. C. C.; RODRIGUES, E.; SCALCO, N.; NEGRI, G.; LAGO, J. H. G. Variation in the amounts of volatile constituents of *Cymbopogon citratus* (DC) Staf, Poaceae, collected in different regions of São Paulo State. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 20, no. 5, p. 686–691, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000026>.

GARCIA, R.; ALVES, E. S. S.; SANTOS, M. P.; VIÉGAS AQUIJE, G. M. F.; FERNANDES, A. A. R.; DOS SANTOS, R. B.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 39, no. 1, p. 163–168, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000100032>.

GLICERINA, V.; SIROLI, L.; BETORET, E.; CANALI, G.; DALLA ROSA, M.; LANCIOTTI, R.; ROMANI, S. Characterization and evaluation of the influence of an alginate, cocoa and a bilayer alginate–cocoa coating on the quality of fresh-cut oranges during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, vol. 102, no. 11, p. 4454–4461, 30 Aug. 2022. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11799>.

GODOY, J. A.; HERNÁNDEZ, T. J. G.; LEAL, L. C. S.; MORA, R. M. S.; CATIBLANCO, G. N. C.; ÁVILA, W. A. D.; ARCHILA, E. G. Efecto de los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* (DC.)

Stapf (limonaria) y *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson (pronto alivio) sobre *Xanthomonas axonopodis* y *Ralstonia sp.* **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, vol. 25, no. 4, 2021.

GOMES FILHO, A., DE OLIVEIRA, T. F., DE OLIVEIRA, S. L., SILVA, G. G., & CHAGA, L. M. Qualidade pós-colheita de goiabas 'Pedro Sato' tratadas com diferentes concentrações de fécula de mandioca associadas a substâncias antifúngicas. **Agri-Environmental Sciences**, vol. 2, no.1, p. 37-51, 2016. <https://doi.org/10.36725/agries.v2i1.189>

GONÇALVES, A. H.; PEREIRA, A. S.; SANTOS, G. R. S.; GUIMARÃES, L. G. L. Fungitoxicity in vitro of essential oils from *Lippia sidoides* Cham., *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. and their major constituents in the control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, vol. 17, no. 4, p. 1007–1015, 2015. https://doi.org/10.1590/1983-084X/14_166.

GONÇALVES, M. S. **Uso sustentável de pesticidas. Análise comparativa entre a União Europeia e o Brasil**. 2016. 115–121 f. Tese (Doutorado em Ciências do Ambiente) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2016. Available at: <https://repositorio.ul.pt/handle/10451/23971>. Accessed on: 14 May 2023.

GONÇALVES, Nathalia Dias; **Encapsulação de óleo essencial de tomilho e avaliação como potencial ingrediente funcional tecnológico**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo – Universidade Estadual de Campinas, Limeira, SP, 2016. <https://doi.org/10.47749/T/UNICAMP.2016.970497>.

GONÇALVES, Nathalia Dias; PENA, F. de L.; SARTORATTO, A.; DERLAMELINA, C.; DUARTE, M. C. T.; ANTUNES, A. E. C.; PRATA, A. S. Encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil used as a natural preservative in bakery product. **Food Research International**, vol. 96, p. 154–160, Jun. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.006>.

GRANDE TOVAR, C. D.; DELGADO-OSPINA, J.; NAVIA PORRAS, D. P.; PERALTA-RUIZ, Y.; CORDERO, A. P.; CASTRO, J. I.; CHAUR VALENCIA, M. N.; MINA, J. H.; CHAVES LÓPEZ, C. *Colletotrichum gloesporioides* inhibition in situ by chitosan-*Ruta graveolens* essential oil coatings: effect on microbiological, physicochemical, and organoleptic properties of Guava (*Psidium guajava* L.) during room temperature storage. **Biomolecules**, vol. 9, no. 9, p. 399, 22 Aug. 2019. <https://doi.org/10.3390/biom9090399>.

GUERRINI, A.; TACCHINI, M.; CHIOCCHIO, I.; GRANDINI, A.; RADICE, M.; MARESCA, I.; PAGANETTO, G.; SACCHETTI, G. A. Comparative study on chemical compositions and biological activities of four Amazonian Ecuador essential oils: *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae), *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, (Poaceae), *Ocimum campechianum* Mill. (Lamiaceae), and *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae). **Antibiotics**, vol. 12, no. 1, 1 Jan. 2023. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010177>.

GUIMARÃES, M.C., MARANGONI JUNIOR, L., DE SOUZA TEODORO, C.E., PRATA, A.S. AND DE MELO, N.R. Effect of microencapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil on the antimicrobial and physicochemical properties of starch food packaging. **International Journal of Food Science & Technology**, vol. 59, no 5, p. 3381-3390, 27 March 2024. <https://doi.org/10.1111/ijfs.17087>.

HAYASHI, K.; IMANISHI, N.; KASHIWAYAMA, Y.; KAWANO, A.; TERASAWA, K.; SHIMADA, Y.; OCHIAI, H. Inhibitory effect of cinnamaldehyde, derived from Cinnamomi cortex, on the growth of influenza A/PR/8 virus *in vitro* and *in vivo*. **Antiviral Research**, vol. 74, no. 1, p. 1–8, Apr. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.01.003>.

HE, L. L.; ZHAO, Y.; FAN, L. M.; ZHAN, J. J.; TAO, L. H.; YANG, Y. H.; SU, F. W.; CHEN, Q. Bin; YE, M. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of *Cymbopogon citratus* essential oils from different climate conditions against *Botrytis cinerea*. **Scientia Horticulturae**, vol. 308, 27 Jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111544>.

HENDGES, C.; STANGARLIN, J. R.; ZAMBAN, V. C.; MASCARO, M. de H. N.; CARMELO, D. B. Antifungal activity and control of the early blight in tomato through tea tree essential oil. **Crop Protection**, vol. 148, p. 105728, 1 Oct. 2021. DOI 10.1016/j.cropro.2021.105728. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261219421001988>. Accessed on: 8 Aug. 2022.

HERNÁNDEZ-NAVA, R.; LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E.; RAMÍREZ-CORONA, N.; JIMÉNEZ-MUNGUÍA, M. T. Encapsulation of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) by complex coacervation between gelatin and chia mucilage and its properties after spray drying. **Food Hydrocolloids**, vol. 109, 1 Dec. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106077>.

HESHMATI, A.; NILI-AHMADABADI, A.; RAHIMI, A.; VAHIDINIA, A.; TAHERI, M. Dissipation behavior and risk assessment of fungicide and insecticide residues in grape under open-field, storage and washing conditions. **Journal of Cleaner Production**, vol. 270, p. 122287, Oct. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122287>.

HOU, C. Y.; HAZEENA, S. H.; HSIEH, S. L.; LI, B. H.; CHEN, M. H.; WANG, P. Y.; ZHENG, B. Q.; LIANG, Y. S. Effect of D-Limonene nanoemulsion edible film on banana (*Musa sapientum* Linn.) Post-Harvest Preservation. **Molecules**, vol. 27, no. 19, 1 Oct. 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27196157>.

HUANG, X.; LAO, Y.; PAN, Y.; CHEN, Y.; ZHAO, H.; GONG, L.; XIE, N.; MO, C.-H. Synergistic antimicrobial effectiveness of plant essential oil and its application in seafood preservation: a review. **Molecules**, vol. 26, no. 2, p. 307, 9 Jan. 2021. DOI 10.3390/molecules26020307. Available at: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/2/307>.

IBGE. Ranking Agricultura, Valor da produção. 2023. **Produção Agropecuária**. Available at: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/>. Accessed on: 16 Jun. 2024.

INCA. Posicionamento do INCA acerca dos agrotóxicos. 12 Jun. 2023. **Notas Técnicas do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - Ministério da Saúde**. Available at: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/notas-tecnicas/posicionamento-do-inca-acerca-dos-agrotoxicos>. Accessed on: 14 May 2024.

IPEA. 2019. Objetivos de desenvolvimento sustentável: 2. Fome zero e agricultura sustentável. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada**. Disponível em: <https://www.ipea.gov.br/ods/ods2.html>

JARDIM, I. N.; OLIVEIRA, D. F.; SILVA, G. H.; CAMPOS, V. P.; DE SOUZA, P. E. (E)-cinnamaldehyde from the essential oil of *Cinnamomum cassia* controls Meloidogyne incognita in soybean plants. **Journal of Pest Science**, vol. 91, no. 1, p. 479–487, 1 Jan. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0850-3>.

JBRJ. Flora do Brasil under construction. 2020. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Accessed on: 2 Mar. 2020.

JOSEPH, I.; VENKATARAM, S. Indomethacin sustained release from alginate-gelatin or pectin-gelatin coacervates. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 126, no. 1–2, p. 161–168, 29 Dec. 1995. DOI 10.1016/0378-5173(95)00173-5. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378517395001735>.

KADER, A. A. Methods of gas mixing, sampling, and analysis. **Postharvest technology of horticultural crops**. 3rd ed. Davis, Califórnia: University of California. Division of Agriculture and Natural Resources Publication, 2002. p. 145-148.

KAMSU, N. P.; TCHINDA, S. E.; TCHAMENI, N. S.; JAZET, D. P. M.; MADJOUKO, M. A.; YOUASSI YOUASSI, O.; SAMEZA, M. L.; TCHOUMBOUGNANG, F.; MENUT, C. Antifungal activities of essential oils of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and lemongrass (*Cymbopogon citratus*) on crown rot pathogens of banana. **Indian Phytopathology**, vol. 72, no. 1, p. 131–137, 13 Mar. 2019. <https://doi.org/10.1007/s42360-018-0104-1>.

KHATRI, D.; PANIGRAHI, J.; PRAJAPATI, A.; BARIYA, H. Attributes of *Aloe vera* gel and chitosan treatments on the quality and biochemical traits of post-harvest tomatoes. **Scientia Horticulturae**, vol. 259, p. 108837, Jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108837>.

KULCU, R. Determination of the effects of different packaging methods and materials on storage time of dried apple. **MATTER: International Journal of Science and Technology**, vol. 4, no. 2, p. 238–255, 1 Nov. 2018. DOI 10.20319/mijst.2018.42.238255. Available at: <https://grdspublishing.org/index.php/matter/article/view/1708>.

KUYU, C. G.; TOLA, Y. B. Assessment of banana fruit handling practices and associated fungal pathogens in Jimma town market, southwest Ethiopia. **Food Science & Nutrition**, vol. 6, no. 3, p. 609–616, 8 May 2018. DOI 10.1002/fsn3.591. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/fsn3.591>.

LANDI, L.; PERALTA-RUIZ, Y.; CHAVES-LÓPEZ, C.; ROMANAZZI, G. Chitosan coating enriched With *Ruta graveolens* L. essential oil reduces postharvest anthracnose of papaya (*Carica papaya* L.) and modulates defense-related gene expression. **Frontiers in Plant Science**, vol. 12, 11 Nov. 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.765806>.

LI, J.; MAO, L.; ZHANG, Y.; ZHANG, L.; JIANG, H. Phytochemical changes in mango fruit in response to *Alternaria alternata* infection. **Czech Journal of Food Sciences**, vol. 36, no. 3, p. 227–232, 30 Jun. 2018. <https://doi.org/10.17221/328/2017-CJFS>.

LOBÃO, A. Q.; ARAUJO, D. S. D. de; KURTZ, B. C. Annonaceae das restingas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, vol. 56, p. 85–96, 2005. DOI 10.2307/23498264. Available at: <https://www.jstor.org/stable/23498264>. Accessed on: 16 Mar. 2020.

LUO, D.; YE, S.; QU, G.; BA, L. Inhibitory effect and action mechanism of citral against black rot in pitaya fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, vol. 131, p. 102275, May 2024. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2024.102275>.

LV, Y.; YANG, F.; LI, X.; ZHANG, X.; ABBAS, S. Formation of heat-resistant nanocapsules of jasmine essential oil via gelatin/gum arabic based complex coacervation. **Food Hydrocolloids**, vol. 35, p. 305–314, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.003>.

MACEDO, S. A.; LUNDGREN, G. A.; DOS PASSOS BRAGA, S.; DE SOUZA, E. L.; CÂMARA, M. P. S. Combined chitosan and *Cymbopogon citratus* (D.C. ex Nees) Stapf. essential oil to inhibit the fungal phytopathogen *Paramyothecium roridum* and control crater rot in melon (*Cucumis melo* L.). **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 51, no. 4, p. 2057–2065, 2020. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00378-y>.

MANVITHA, K.; BIDYA, B. Review on pharmacological activity of *Cymbopogon citratus*. ~ 5 ~ **International Journal of Herbal Medicine**, vol. 1, no. 6, p. 5–7, 2014. Available at: www.ukessays.com.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento -Agrofit. 2016. **Relatório de Pragas e Doenças: Podridão-negra do Abacaxi**. Accessed on: 30 Mar. 2018.

MARTINKO, K.; IVANKOVIĆ, S.; LAZAREVIĆ, B.; ĐERMIĆ, E.; ĐERMIĆ, D. Control of early blight fungus (*Alternaria alternata*) in tomato by boric and phenylboronic acid. **Antibiotics**, vol. 11, no. 3, p. 320, 28 Feb. 2022. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030320>.

MASEKO, K. H.; REGNIER, T.; MEIRING, B.; WOKADALA, O. C.; ANYASI, T. A. Musa species variation, production, and the application of its processed flour: A review. **Scientia Horticulturae**, vol. 325, p. 112688, Feb. 2024. DOI 10.1016/j.scienta.2023.112688. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423823008567>.

MATASYOH, J. C.; WAGARA, I. N.; NAKAVUMA, J. L.; KIBURAI, A. M. Chemical composition of *Cymbopogon citratus* essential oil and its effect on mycotoxigenic *Aspergillus species*. **African Journal of Food Science**, vol. 5, no. 3, p. 138–142, 2011. Available at: <http://www.academicjournals.org/ajfs>.

MBENOUN, M.; DE BEER, Z. W.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D.; ROUX, J. Reconsidering species boundaries in the *Ceratocystis paradoxa* complex, including a new species from oil palm and cacao in Cameroon. **Mycologia**, vol. 106, no. 4, p. 757–784, 2014. <https://doi.org/10.3852/13-298>.

MCCLEMENTS, D. J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 47, no. 7, p. 611–649, 27 Sep. 2007. <https://doi.org/10.1080/10408390701289292>.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 51, no4, p. 285–330, 2011. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.559558>.

MEENA, M.; ZEHRA, A.; DUBEY, M. K.; AAMIR, M.; GUPTA, V. K.; UPADHYAY, R. S. Comparative evaluation of biochemical changes in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) infected by *Alternaria alternata* and its toxic metabolites (TeA, AOH, and AME). **Frontiers in Plant Science**, vol. 7, 22 Sep. 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01408>.

MEJIA, L. F. **Evaluacion del comportamiento fisico y quimico poscosecha del platano dominico harton (Musa AAB Simmonds) cultivado en el municipio de Belalcazar (Caldas)**. 2013. 13–20 f. Disertación (Ciencia y Tecnología de Alimentos) – Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, Santafé de Bogotá, 2013.

MELO, N.F.C.B.; DE LIMA M.A.B.; STAMFORD, T.L.M.; GALEMBECK, A.; FLORES, M.A.P.; DE CAMPOS TAKAKI, G.M.; DA COSTA MEDEIROS J.A.; STAMFORD-ARNAUD, T.M.; MONTENEGRO STAMFORD, T.C. *In vivo* and *in vitro* antifungal effect of fungal chitosan nanocomposite edible coating against strawberry phytopathogenic fungi. **International Journal of Food Science & Technology**, vol. 55, no 11, p. 3381-3391, jun. 2020. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14669>

MELO JÚNIOR, J. C. F. de; BOEGER, M. R. T. Riqueza, estrutura e interações edáficas em um gradiente de restinga do Parque Estadual do Acaraí, Estado de Santa Catarina, Brasil [Richness, structure, and edaphic interactions in the restinga gradient of Parque Estadual do

Acaraí, Santa Catarina State. **Hoehnea**, vol. 42, no. 2, p. 207–232, 2015. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-40/2014>.

MIASTKOWSKA, M.; MICHALCZYK, A.; FIGACZ, K.; SIKORA, E. Nanoformulations as a modern form of biofungicide. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, vol. 18, no. 1, p. 119–128, 31 Jun. 2020. <https://doi.org/10.1007/s40201-020-00445-4>.

MISUMI, S. Y.; BARROS, M. A.; VILELA, C. G.; BARTH, O. M. Non-pollen palynomorphs from bottom surface sediments of “Lagoa Comprida” Lake, “Restinga de Jurubatiba” National Park, RJ, Brazil. **Anuário do Instituto de Geociências - UFRJ**, vol. 41, no. 2, p. 344–350, 20 Aug. 2018. https://doi.org/10.11137/2018_2_344_350.

MOGHADDAM, G. A.; REZAYATMAND, Z.; NASR ESFAHANI, M.; KHOZAEI, M. Genetic defense analysis of tomatoes in response to early blight disease, *Alternaria alternata*. **Plant Physiology and Biochemistry**, vol. 142, p. 500–509, Sep. 2019a. DOI 10.1016/j.plaphy.2019.08.011. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942819303171>.

MOLINA, A. B.; FLÓREZ-CASTILLO, J. M. (2020). Biopolímeros como sistemas de bioencapsulación. **Research Gate**, 2-9. Recuperado el 08 de 08 de 2022, de https://www.researchgate.net/publication/343452469_Biopolimeros_como_sistemas_de_bioencapsulacion

MONTEIRO, M. C.; DE LA CRUZ, M.; CANTIZANI, J.; MORENO, C.; TORMO, J. R.; MELLADO, E.; DE LUCAS, J. R.; ASENSIO, F.; VALIANTE, V.; BRAKHAGE, A. A.; LATGÉ, J. P.; GENILLOUD, O.; VICENTE, F. A new approach to drug discovery: High-throughput screening of microbial natural extracts against *Aspergillus fumigatus* using resazurin. **Journal of Biomolecular Screening**, vol. 17, no. 4, p. 542–549, Apr. 2012. <https://doi.org/10.1177/10870571111433459>.

MÜLLER, R. H.; JACOBS, C.; KAYSER, O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 47, no. 1, p. 3–19, Mar. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00118-6](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00118-6).

MUÑOZ CASTELLANOS, L.; AMAYA OLIVAS, N.; AYALA-SOTO, J.; DE LA O CONTRERAS, C. M.; ZERMEÑO ORTEGA, M.; SANDOVAL SALAS, F.; HERNÁNDEZ-OCHOA, L. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) and pepper (*Piper nigrum* L.) essential oils and functional extracts against *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus niger* in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **International Journal of Microbiology**, vol. 2020, p. 1–8, 1 May 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1702037>.

MUSTAFA, I. F.; HUSSEIN, M. Z. Synthesis and technology of nanoemulsion-based pesticide formulation. **Nanomaterials**, vol. 10, no. 8, p. 1–26, 1 Aug. 2020. <https://doi.org/10.3390/nano10081608>.

NAPIÓRKOWSKA, A.; KUREK, M. Coacervation as a Novel Method of Microencapsulation of Essential Oils—A Review. **Molecules**, vol. 27, no. 16, p. 5142, 12 Aug. 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27165142>.

NASCIMENTO, S. M. C. do; NAKASONE, A. K.; OLIVEIRA NETO, C. F.; ALVES, K. F.; ALENCAR SOBRINHO, R. S.; CONCEIÇÃO, S. S.; CAMPOS, K. R. de A.; CARVALHO, E. de A. Patogenicidade e caracterização de *Thielaviopsis ethacetica* em palma de óleo. **Summa Phytopathologica**, vol. 46, no. 3, p. 236–241, Sep. 2020. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/193244>.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 2020. **Captan, CID=8606**. Accessed on: 7 Apr. 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, vol. 75, no. 3, p. 311–335, 23 Mar. 2012. <https://doi.org/10.1021/np200906s>.

NIELSEN, S. S. **Food Analysis Laboratory Manual**. 3rd ed. Cham: Springer International Publishing, 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-44127-6>.

NURNADIRAH, M. N.; NENI, K. C. M. R.; YUZIAH, M. Y. N. Evaluation of antifungal activity of antagonistic bacteria against butt rot disease pathogen of pineapple. **Walailak Journal of Science and Technology**, vol. 15, no. 4, p. 283–293, 2018. <https://doi.org/10.14456/vol15iss1pp>.

OKCU, Z.; YAVUZ, Y.; KERSE, S. Edible film and coating applications in fruits and vegetables. **Alinteri Zirai Bilimler Dergisi**, vol. 33, no. 2, p. 221–226, 29 Dec. 2018. <https://doi.org/10.28955/alinterizbd.368362>.

OLIVEIRA, B. R. de. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera* sp. e estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti***. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008. <https://doi.org/10.11606/D.60.2008.tde-31032009-132918>.

OLIVEIRA FILHO, J. G. de; SILVA, G. da C.; OLDONI, F. C. A.; MIRANDA, M.; FLORENCIO, C.; OLIVEIRA, R. M. D. de; GOMES, M. de P.; FERREIRA, M. D. Edible coating based on carnauba wax nanoemulsion and *Cymbopogon martinii* essential oil on papaya postharvest preservation. **Coatings**, vol. 12, no. 11, p. 1700, 8 Nov. 2022. DOI 10.3390/coatings12111700. Available at: <https://www.mdpi.com/2079-6412/12/11/1700>.

ONAWUNMIA, G. O; YISAKB, W.-A.; OGUNLANAA', E. O. **Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf**. [S. l.: s. n.], 1984.

OSTERTAG, F.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Journal of Colloid and Interface Science**, vol. 388, no. 1, p. 95–102, Dec. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.07.089>.

OTONI, C. G.; MOURA, M. R. de; AOUADA, F. A.; CAMILLOTO, G. P.; CRUZ, R. S.; LOREVICE, M. V.; SOARES, N. de F. F.; MATTOSO, L. H. C. Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. **Food Hydrocolloids**, vol. 41, p. 188–194, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.013>.

PARETA, R.; EDIRISINGHE, M. A novel method for the preparation of starch films and coatings. **Carbohydrate Polymers**, vol. 63, no. 3, p. 425–431, 3 Mar. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.09.018>.

PASCUAL-VILLALOBOS, M. J.; GUIRAO, P.; DÍAZ-BAÑOS, F. G.; CANTÓ-TEJERO, M.; VILLORA, G. Oil in water nanoemulsion formulations of botanical active substances. **Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives**. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 223–247. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815829-6.00009-7>.

PEDROTTI, C.; FRANZOI, C.; ROSA, M. T. S.; TRENTIN, T. R.; VILASBOA, J.; SCARIOT, F. J.; ECHEVERRIGARAY, S. L.; SCHWAMBACH, J. Antifungal activity of essential oil from *Eucalyptus staigeriana* against *Alternaria alternata* causing of leaf spot and black rot in table grapes. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, vol. 94, no. 2, p. e20200394, 2022. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202220200394>.

PERALTA-RUIZ, Y.; GRANDE TOVAR, C.; SINNING-MANGONEZ, A.; BERMONT, D.; PÉREZ CORDERO, A.; PAPARELLA, A.; CHAVES-LÓPEZ, C. *Colletotrichum gloesporioides* inhibition using chitosan-*Ruta graveolens* L essential oil coatings: Studies *in vitro* and *in situ* on *Carica papaya* fruit. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 326, p. 108649, Aug. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108649>.

PERALTA-RUIZ, Y.; TOVAR, C. D. G.; SINNING-MANGONEZ, A.; CORONELL, E. A.; MARINO, M. F.; CHAVES-LOPEZ, C. Reduction of postharvest quality loss and microbiological decay of tomato “Chonto” (*Solanum lycopersicum* L.) using chitosan-E essential oil-based edible coatings under low-temperature storage. **Polymers**, vol. 12, no. 8, p. 1822, 13 Aug. 2020. DOI 10.3390/polym12081822. Available at: <https://www.mdpi.com/2073-4360/12/8/1822>.

PEREIRA, M. N.; CONCEIÇÃO, R. B. da; CRUZ, J. C. S.; ANDRADE, M. C. N. de. Efeito de óleos essenciais sobre o fungo *Thielaviopsis paradoxa*. **Ambiência**, vol. 14, no. 3, 2018. <https://doi.org/10.5935/ambiencia.2018.03.06>.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, vol. 23, no. Sup 4, p. S612–S621, 2007.

PIACENTINI, E.; GIORNO, L.; DRAGOSAVAC, M. M.; VLADISAVLJEVIĆ, G. T.; HOLDICH, R. G. Microencapsulation of oil droplets using cold water fish gelatine/gum arabic complex coacervation by membrane emulsification. **Food Research International**, vol. 53, no. 1, p. 362–372, Aug. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.012>.

PICCIONE, G. **Raccomandazione (UE) per il monitoraggio di tossine dell'Alternaria**. Rutigliano, Italia, 2022.

PINHO, D. B.; DUTRA, D. C.; PEREIRA, O. L. Notes on *Ceratocystis paradoxa* causing internal post-harvest rot disease on immature coconut in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, vol. 38, no. 2, p. 152–157, Apr. 2013. DOI 10.1590/S1982-56762013000200010. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1982-56762013000200010&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3rd ed. Boston, MA: Springer US, 2009. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>.

PRABHA, T. N.; BHAGYALAKSHMI, N. Carbohydrate metabolism in ripening banana fruit. **Phytochemistry**, vol. 48, no. 6, p. 915–919, Jul. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00931-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00931-X).

PRATA, A. S.; GROSSO, C. R. F. Influence of the oil phase on the microencapsulation by complex coacervation. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, vol. 92, no. 7, p. 1063–1072, 1 Jul. 2015. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2670-z>.

QIN, Q.; FAN, Y.; JIA, Q.; DUAN, S.; LIU, F.; JIA, B.; WANG, G.; GUO, W.; WANG, C. The potential of *Alternaria* toxins production by *A. alternata* in processing tomatoes. **Toxins**, vol. 14, no. 12, p. 827, 24 Nov. 2022. <https://doi.org/10.3390/toxins14120827>.

RESENDE, J. M.; CHITARRA, M. I.; MALUF, W. R.; CHITARRA, A. B.; SAGGIN Jr., O. J. Atividade de enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase durante o amadurecimento de tomates do grupo multilocular. **Horticultura Brasileira**, vol. 22, no. 2, p.206-201, jun. 2004. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362004000200009>.

RIBES, S.; FUENTES, A.; TALENS, P.; BARAT, J. M.; FERRARI, G.; DONSI, F. Influence of emulsifier type on the antifungal activity of cinnamon leaf, lemon and bergamot oil nanoemulsions against *Aspergillus niger*. **Food Control**, vol. 73, p. 784–795, Mar. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.044>.

RIZWANA, H.; BOKAHRI, N. A.; ALSAHLI, S. A.; AL SHOWIMAN, A. S.; ALZHRANI, R. M.; ALDEHAISH, H. A. Postharvest disease management of *Alternaria* spots on tomato fruit by *Annona muricata* fruit extracts. **Saudi Journal of Biological Sciences**, vol. 28, no. 4, p. 2236–2244, Apr. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.01.014>.

ROCHA, L. O.; BARROSO, V. M.; ANDRADE, L. J.; PEREIRA, G. H. A.; FERREIRA-CASTRO, F. L.; DUARTE, A. P.; MICHELOTTO, M. D.; CORREA, B. FUM gene expression profile and Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* inoculated in Bt and Non-Bt maize. **Frontiers in Microbiology**, vol. 6, 6 Jan. 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01503>.

RODRIGUES, C.; MASSAROTO, J. A.; PERES, G. Q. D.; DE MATOS, D. L.; PERES, W. M.; YAMASHITA, O. M.; DE CARVALHO, M. A. C. Evaluation of high dilutions extract of pyroligneous on the development of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, vol. 11 no. 2, p. 69-77, Fev 2020. <https://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2020.002.0008>

SAFAYA, M.; ROTLIWALA, Y. C. Nanoemulsions: A review on low energy formulation methods, characterization, applications and optimization technique. 27., 1 Jan. 2020. **Materials Today: Proceedings** [...]. [S. l.]: Elsevier Ltd, 1 Jan. 2020. vol. 27, p. 454–459. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.11.267>.

SAMPAIO, Taís Santos; NIZIO, D. A. de C.; WHITE, L. A. S.; MELO, J. de O.; ALMEIDA, C. S.; ALVES, M. F.; GAGLIARDI, P. R.; ARRIGONI-BLANK, M. de F.; WISNIEWSKI JUNIOR, A.; SOBRAL, M. E. G.; BLANK, A. F. Chemical diversity of a wild population of *Myrcia ovata* Cambessedes and antifungal activity against *Fusarium solani*. **Industrial Crops and Products**, vol. 86, p. 196–209, Aug. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.042>.

SAMPAIO, T.S.; BLANK, A. F.; GAGLIARDI, P. R.; WISNIEWSKI, A.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; NIZIO, D. A. C.; ALVES, M. F.; DE NASCIMENTO JUNIOR, A. F. Antifungal activity of essential oils of *Myrcia ovata* chemotypes and their major compounds on phytopathogenic fungi | Atividade antifúngica dos óleos essenciais de quimiotipos de *Myrcia ovata* e seus compostos majoritários sobre fungos fitopatogênicos. **Bioscience Journal**, vol. 36, no. 2, p. 364–375, 2020. <https://doi.org/10.14393/BJ-v36n2a2020-42315>.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHÁFER, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. **Carbohydrate Polymers**, vol. 82, no. 2, p. 277–283, Sep. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.047>.

SANTOS, G. G.; MATTOS, L. M.; MORETTI, C. L. Quality and occurrence of mycotoxins in tomato products in the Brazilian market. **Enzyme Engineering**, vol. 5, no. 3, p. 1–7, 2016. DOI 10.4172/2329-6674.1000156. Available at: <https://www.omicsgroup.org/journals/quality-and-occurrence-of-mycotoxins-in-tomato-products-in-the-brazilian-market-2329-6674-1000156.php?aid=88037>.

SANZANI, S. M.; GALLONE, T.; GARGANESE, F.; CARUSO, A. G.; AMENDUNI, M.; IPPOLITO, A. Contamination of fresh and dried tomato by *Alternaria* toxins in southern Italy. **Food Additives & Contaminants: Part A**, vol. 36, no. 5, p. 789–799, 4 May 2019. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1588998>.

SARAVANAN, M.; RAO, K. P. Pectin–gelatin and alginate–gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, vol. 80, no. 3, p. 808–816, 5 May 2010. DOI 10.1016/j.carbpol.2009.12.036. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861709007553>.

SCARIOT, F. J.; FORESTI, L.; DELAMARE, A. P. L.; ECHEVERRIGARAY, A. P. L. S. Activity of monoterpenoids on the *in vitro* growth of two *Colletotrichum* species and the mode of action on *C. acutatum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 170, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104698>.

SCHRAMM, L. L.; STASIUK, E. N.; MARANGONI, D. G. Surfactants and their applications. **Annual Reports on the Progress of Chemistry - Section C**, vol. 99, p. 3–48, 2003. <https://doi.org/10.1039/B208499F>.

SEGATO, M. P. **Estudos termoanalíticos do ácido algínico e dos alginatos de metais alcalinos, alcalino-terrosos amonio, mono-, di- e trietanolamônico**. 2007. 14–19 f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Química Analítica) – Universidade de Sao Paulo, Sao Carlos, SP, 2007.

SHAH, G.; SHRI, R.; PANCHAL, V.; SHARMA, N.; SINGH, B.; MANN, A. S. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research**, vol. 2, no. 1, p. 3–8, 2011. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.79796>.

SHARMA, R. L.; AHIR, R. R.; YADAV, S. L.; SHARMA, P.; GHASOLIA, R. P. Effect of nutrients and plant extracts on *Alternaria* blight of tomato caused by *Alternaria Alternata*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, vol. 128, no. 4, p. 951–960, 16 Aug. 2021. <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00485-4>.

SHINDE, U.; NAGARSENKER, M. S. Characterization of gelatin-sodium alginate complex coacervation system. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 71, no. 3, p. 313, 2009. DOI 10.4103/0250-474X.56033. Available at: <http://www.ijpsonline.com/text.asp?2009/71/3/313/56033>.

SINGH, B. K.; DELGADO-BAQUERIZO, M.; EGIDI, E.; GUIRADO, E.; LEACH, J. E.; LIU, H.; TRIVEDI, P. Climate change impacts on plant pathogens, food security and paths forward.

Nature Reviews Microbiology, vol. 21, no. 10, p. 640–656, 1 Oct. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00900-7>.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. **Journal of Food Engineering**, vol. 50, no. 3, p. 149–155, Nov. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00237-5](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00237-5).

SOUZA, D. P.; PIMENTEL, R. B. Q.; SANTOS, A. S.; ALBUQUERQUE, P. M.; FERNANDES, A. V.; JUNIOR, S. D.; OLIVEIRA, J. T. A.; RAMOS, M. V.; RATHINASABAPATHI, B.; GONÇALVES, J. F. C. Fungicidal properties and insights on the mechanisms of the action of volatile oils from Amazonian *Aniba* trees. **Industrial Crops and Products**, vol. 143, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111914>.

SPRING, M. A. Ethnopharmacologic analysis of medicinal plants used by laotian hmong refugees in minnesota. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 26, no. 1, p. 65–91, Jun. 1989. DOI 10.1016/0378-8741(89)90114-1. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378874189901141>.

STAUFFER, E.; DOLAN, J. A.; NEWMAN, R. Gas chromatography and gas chromatography—mass spectrometry. **Fire Debris Analysis**. [S. l.]: Elsevier, 2008. p. 235–293. <https://doi.org/10.1016/B978-012663971-1.50012-9>.

SUN, Q.; LI, J.; SUN, Y.; CHEN, Q.; ZHANG, L.; LE, T. The antifungal effects of cinnamaldehyde against *Aspergillus niger* and its application in bread preservation. **Food Chemistry**, vol. 317, p. 126405, Jul. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126405>.

SUNDAR, S. K.; PARIKH, J. K. Advances and trends in encapsulation of essential oils. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 635, p. 122668, Mar. 2023. DOI 10.1016/j.ijpharm.2023.122668. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517323000881>.

TAO, N.; OUYANG, Q.; JIA, L. Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism. **Food Control**, vol. 41, p. 116–121, Jul. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.010>.

TEO, S.Y.; LEE, S.Y.; ONG, H.L.; ONG, C.L.; GAN, S.N.; RATHBONE, M.J.; COOMBES, A.G.A. Evaluation of biosourced alkyd nanoemulsions as drug carriers. **Journal of Nanomaterials**, vol. 2015, no 1, p. 537598, 2015, 03 Nov. 2015 <https://doi.org/10.1155/2015/537598>.

THOMPSON, A. K.; SUPAPVANICH, S.; SIRISON, J. Banana ripening. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 25–55. DOI 10.1007/978-3-030-27739-0. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-27739-0>.

TIETBOHL, L. A. C.; BARBOSA, T.; FERNANDES, C. P.; SANTOS, M. G.; MACHADO, F. P.; SANTOS, K. T.; MELLO, C. B.; ARAÚJO, H. P.; GONZALEZ, M. S.; FEDER, D.; ROCHA, L. Laboratory evaluation of the effects of essential oil of *Myrciaria floribunda* leaves on the development of *Dysdercus peruvianus* and *Oncopeltus fasciatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 24, no. 3, p. 316–321, May 2014. DOI 10.1016/j.bjp.2014.07.009. Available at: <http://www.scielo.br/j/rbfar/a/sqnG5rVpf9QKxLjRr7gScPn/?lang=en>. Accessed on: 22 Oct. 2021.

TILOCCA, B.; CAO, A.; MIGHELI, Q. Scent of a Killer: Microbial volatilome and its role in the biological control of plant pathogens. **Frontiers in Microbiology**, vol. 11, 7 Feb. 2020. DOI 10.3389/fmicb.2020.00041. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.00041/full>. Accessed on: 5 May 2020.

TIWARI, A.; UPADHYAY, R. S. *Alternaria alternata* infection in tomato adversely affects the nutritional parameters of tomato. **International Journal of Agricultural Technology**, vol. 12, no. 6, p. 1083–1098, 2016.

TOMAZONI, E. Z.; PAULETTI, G. F.; DA SILVA RIBEIRO, R. T.; MOURA, S.; SCHWAMBACH, J. *In vitro* and *in vivo* activity of essential oils extracted from *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus globulus* and *Cinnamomum camphora* against *Alternaria solani* Sorauer causing early blight in tomato. **Scientia Horticulturae**, vol. 223, p. 72–77, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.04.033>.

TOLSTOGUZOV, V. (2002). thermodynamic aspects of biopolymer functionality in biological systems, foods, and beverages. **Critical Reviews in Biotechnology**, vol. 22, no.2, 89–174. doi:10.1080/07388550290789478.

TYAGI, S.; LEE, K.-J.; SHUKLA, P.; CHAE, J.-C. Dimethyl disulfide exerts antifungal activity against *Sclerotinia minor* by damaging its membrane and induces systemic resistance in host plants. **Scientific Reports**, vol. 10, no. 1, p. 6547, 16 Apr. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63382-0>.

TZORTZAKIS, N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, vol. 8, no. 2, p. 253–258, Jun. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.01.002>.

UPADHAYAY, J.; RANA, M.; JUYAL, V.; BISHT, S. S.; JOSHI, R. Impact of pesticide exposure and associated health effects. **Pesticides in Crop Production**. [S. l.]: Wiley, 2020. p. 69–88. DOI 10.1002/9781119432241.ch5. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119432241.ch5>.

VALERO-VALDIVIESO, M. F.; ORTEGÓN, Y.; USCATEGUI, Y. Biopolímeros: avances y perspectivas / biopolymers: progress and prospects. vol. 80, p. 171–180, 2013.

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, vol. 90, no. 1 suppl 1, p. 763–778, 16 Apr. 2018. DOI 10.1590/0001-3765201820170653. Available at: <http://www.scielo.br/j/aabc/a/4By5tyDMXRcCvx8kD9GwLnr/?lang=en>. Accessed on: 28 Aug. 2021.

VIANA, V. C. R.; MACHADO, F. P.; ESTEVES, R.; DUARTE, J. A. D.; ENRÍQUEZ, J. J. S.; CAMPAZ, M. L. M.; OLIVEIRA, E. E.; SANTOS, M. G.; RICCI-JUNIOR, E.; RUPPELT, B. M.; ROCHA, L. Green nanobioinsecticide of a Brazilian endemic plant for the *Aedes aegypti* control. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, vol. 32, p. 100992, May 2023. DOI 10.1016/j.scp.2023.100992. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352554123000268>.

VIANA, V.; ESTEVES, R. *Xylopiá ochrantha* Mart. In: MACHADO, L.; RUPPELT, B. M.; SANTOS, M. G. (eds.). **Plantas da Restinga: Fitoquímica e atividade biológica**. 1st ed. Rio de Janeiro: Editora Projeto Cultural, 2023. p. 176–181.

WANG, L.; JIANG, N.; WANG, D.; WANG, M. Effects of essential oil citral on the growth, mycotoxin biosynthesis and transcriptomic profile of *Alternaria alternata*. **Toxins**, vol. 11, no. 10, p. 553, 20 Sep. 2019. DOI 10.3390/toxins11100553. Available at: <https://www.mdpi.com/2072-6651/11/10/553>.

WANG, N.; WANG, B.; WAN, Y.; GAO, B.; RAJPUT, V. D. Alginate-based composites as novel soil conditioners for sustainable applications in agriculture: A critical review. **Journal of Environmental Management**, vol. 348, 15 Dec. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119133>.

WEI, L.; CHEN, C.; CHEN, J.; LIN, L.; WAN, C. Possible fungicidal effect of citral on kiwifruit pathogens and their mechanisms of actions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, vol. 114, p. 101631, Apr. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101631>.

WINSTON, P. W.; BATES, D. H. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. **Ecology**, vol. 41, no. 1, p. 232–237, Jan. 1960. <https://doi.org/10.2307/1931961>.

YADAV, A.; KUMAR, A.; SINGH, P. P.; PRAKASH, B. Pesticidal efficacy, mode of action and safety limits profile of essential oils based nanoformulation against *Callosobruchus chinensis* and *Aspergillus flavus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 175, p. 104813, 1 Jun. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2021.104813>. Accessed on: 19 Jul. 2022.

YANG, Jiali; SUN, C.; ZHANG, Y.; FU, D.; ZHENG, X.; YU, T. Induced resistance in tomato fruit by γ -aminobutyric acid for the control of *Alternaria* rot caused by *Alternaria alternata*. **Food**

Chemistry, vol. 221, p. 1014–1020, 15 Apr. 2017. DOI 10.1016/j.foodchem.2016.11.061. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616319100>.

YANG, Jisheng; CHEN, S.; FANG, Y. Viscosity study of interactions between sodium alginate and CTAB in dilute solutions at different pH values. **Carbohydrate Polymers**, vol. 75, no. 2, p. 333–337, Jan. 2009. DOI 10.1016/j.carbpol.2008.07.037. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861708003433>.

YANG, L.-N.; HE, M.-H.; OUYANG, H.-B.; ZHU, W.; PAN, Z.-C.; SUI, Q.-J.; SHANG, L.-P.; ZHAN, J. Cross-resistance of the pathogenic fungus *Alternaria alternata* to fungicides with different modes of action. **BMC Microbiology**, vol. 19, no. 1, p. 205, 2 Dec. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1574-8>.

YANG, Z.; LI, M.; ZHAI, X.; ZHAO, L.; TAHIR, H. E.; SHI, J.; ZOU, X.; HUANG, X.; LI, Z.; XIAO, J. Development and characterization of sodium alginate/tea tree essential oil nanoemulsion active film containing TiO₂ nanoparticles for banana packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 213, p. 145–154, 31 Jul. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.164>.

YASSER, M. M.; MARZOUK, M. M.; KAMEL, T. A.; NAAFFA, A. M. A. Effect of hot water treatment on postharvest fruit rots and quality of tomato fruits. **Plant Archives**, vol. 19, no. 2, p. 2325–2334, 2019.

ZAHARI, R.; HALIMOON, N.; SAJAP, A. S.; AHMAD, M. F.; MOHAMED, M. R. Bioantifungal activity of selected medicinal plant extracts against root rot of fungal disease. **Journal of Plant Sciences**, vol. 2, no. 1, p. 31, 2014. <https://doi.org/10.11648/j.jps.20140201.16>. Accessed on: 18 Mar. 2020.

ZAKER, M. Natural plant products as eco-friendly fungicides for plant diseases control- A Review. **The Agriculturists**, vol. 14, no. 1, p. 134–141, 11 Aug. 2016. <https://doi.org/10.3329/agric.v14i1.29111>

ZHANG, X.; WU, F.; GU, N.; YAN, X.; WANG, K.; DHANASEKARAN, S.; GU, X.; ZHAO, L.; ZHANG, H. Postharvest biological control of *Rhizopus* rot and the mechanisms involved in induced disease resistance of peaches by *Pichia membranefaciens*. **Postharvest Biology and Technology**, vol. 163, p. 111146, 1 May 2020. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111146>. Accessed on: 7 Jul. 2020.

ZHAO, P.; NDAYAMBAJE, J. P.; LIU, X.; XIA, X. Microbial spoilage of fruits: A review on causes and prevention methods. **Food Reviews International**, vol. 38, no. sup1, p. 225-246, Dez 2020. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1858859>

ZORZI TOMAZONI, E.; RIBEIRO, R. T. S.; PAULETTI, G. F.; SOARES, G. L. G.; SCHWAMBACH, J. Inhibition of *Alternaria* stem canker on tomato by essential oils from *Baccharis* species.

Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, vol. 54, no. 9, p. 781–790, 2019.
<https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1633212>.

11.APÊNDICES

Apêndice A - Produção científica do discente de doutorado

O Quadro A1 mostra a relação de produções científicas publicadas e em fase de redação e edição, das quais o autor deste projeto de doutorado pôde participar durante seu doutoramento. A participação nessas publicações foi possível graças ao apoio financeiro da CAPES por meio da concessão de uma bolsa de doutorado.

Quadro A1: Relação de publicações do autor

Produção científica publicada					
No.	Título da publicação	Revista / Editorial	Qualis CAPES /Fator de impacto (FI)	Identificação	Data da publicação
1.	What do we know about the utilization of the Sargassum species as biosorbents of trace metals in Brazil?	Journal of Environmental Chemical Engineering / Elsevier	A1 / FI: 7,4	https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103941	Agosto/2020
2.	Preliminary Diagnostic of the Tourist Potential of a Heritage Town in Colombia	Tourism Planning & Development / Routledge	A2 / FI: 2,1	https://doi.org/10.1080/21568316.2020.1837227	Outubro/2020
3.	Antifungal potential and biosafety of native plants from the Brazilian Restinga ecosystem	Cleaner Engineering and Technology / Elsevier	FI: 5,3	https://doi.org/10.1016/j.clet.2022.100493	Junho/ 2022
4.	Glimpsing the chemical composition and the potential of Myrtaceae plant extracts against the food spoilage fungus <i>Thielaviopsis ethacetica</i>	Food Control / Elsevier	A1/ FI: 5,6	https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109501	Abril/2023
5.	Green Nanobioinsecticide of a Brazilian endemic plant for the <i>Aedes aegypti</i> control	Sustainable Chemistry and Pharmacy / Elsevier	A3 / FI: 5,5	https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.100992	Maio/2023

6.	Capítulo de livro: <i>Neomitranthes obscura</i> (DC.) N. Silveira	Livro: Em: Rocha, L. Ruppelt, M., Santos, M. (Coords), Plantas da restinga - fitoquímica e atividade biológica. (1ª ed, p. 133-139). Rio de Janeiro: Projeto Cultural	N/A	ISBN: 978-85-68126-11-0.	Setembro/2023
7.	Indigenous fungi with the ability to biodegrade hydrocarbons in diesel-contaminated soil are isolated and selected using a simple methodology	Environmental Pollution / Elsevier	A1/ FI: 7,6	https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.124431	Julho/2024
Publicacoes em redação e edição para submissão					
N°	Título da publicação				Revista pretendida para submissão
8.	<i>In vitro</i> and <i>in situ</i> effect of emulsified natural and synthetic volatile plant derivatives on phytopathogenic banana fungus				Postharvest Biology and Technology
9.	Impact of <i>Cymbopogon citratus</i> essential oil microencapsulated by complex coacervation and incorporated in cassava starch-based coatings on the action of the pathogen causing black spot in tomato and the shelf life of the fruit.				Food Research International
10.	Essential oils from South America as product biorational alternatives for controlling plant fungi pathogen: a scoping review				Innovative Food Science & Emerging Technologies
11.	Microencapsulation of essential oils by complex coacervation. In: Prata, A. S. and Kurozawa, L. E. (Ed.), <i>Encapsulation Methods by using Biopolymers</i> .				SpringerProtocols: Methods and Protocols in Food Science (MeFS). <i>(Em revisão pelas editoras)</i> .
12.	The potential of Brazilian and Colombian species from the Myrtaceae and Lauraceae families to control fungi of agricultural, veterinary and clinical interest: a systematic review				International Journal of Biological Macromolecules

Apêndice B

Resultados preliminares extraídos do Relatório de Workshop do PPBI, período de 2021-01.

Quadro 2 apresenta o resultado preliminar do ensaio de microdiluição testado 6 óleos essenciais contra o fungo *Thielaviopsis ethacetica*. Os óleos essenciais testados foram extraídos de material vegetal procedente do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ) e faziam parte do estoque de óleos essenciais do Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais (LTPN/FFUFF) no ano 2021.

Quadro 2 - Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais contra *T. ethacetica*.

Concentração	Tratamentos									
	T18	T13	T14	T17	T16	T8	T11	T12	CV	CE
2,5 µL/mL	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
1,25 µL/mL	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
0,62 µL/mL	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
0,31 µL/mL	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
0,16 µL/mL	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
0,08 µL/mL	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
0,04 µL/mL	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
0,02 µL/mL	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
Escala de cor	Red	Poços sem crescimento				Red	Poços com crescimento			

Óleos essenciais T18: *A. acutiflora*; T13: *M. amazonica*; T14: *M. floribunda*; T17: *X. ochrantha*; T16: *O. pulchella*; T8: *P. spicatus*. Controles – T11: itraconazol (20 µg/mL); T12: 0,01% Tween 80; CV: controle de viabilidade (branco); CE: Controle de esterilidade.

Figura 11 apresenta o resultado das placas de Petri que continham discos de micélio do fungo *Thielaviopsis ethacetica* que foram expostos a meio nutritivo de batata ágar dextrose (BDA) misturado com os óleos essenciais das plantas *Annona acutiflora*, *Myrcia amazonica*, *Myrciaria floribunda*, *Xylopiya ochrantha*, *Ocotea pulchella*, e *Pilocarpus spicatus* na concentração de 2,5 µL/mL. De acordo ao resultado, o fungo na forma de micélio vegetativo não foi susceptível a nenhum dos óleos essenciais, e inclusive, na presença do antifúngico itraconazol, o fungo foi capaz de crescer.

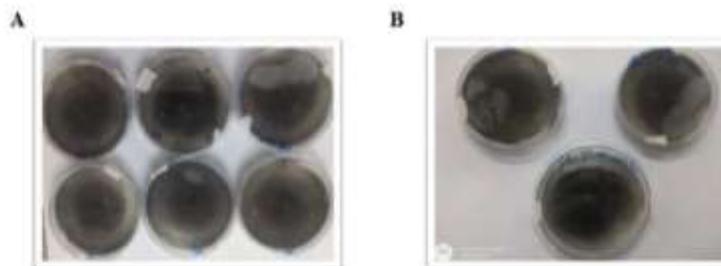


Figura 11. Placas com crescimento micelial exposto a óleos essenciais (A) e aos controles itraconazol, Tween 80 e branco (placa sem tratamento) (B).

Com a finalidade de explorar a atividade fungistática dos óleos inicialmente testados contra *Thielaviopsis ethacetica*, decidiu-se testar estes contra outros fungos disponíveis no Laboratório de Tecnologia Microbiana (LTM/FF/UFF). Os óleos essenciais extraídos de folhas das plantas *Annona acutiflora* (Aa), *Eugenia sulcata* (Es), *Myrcia amazonica* (Ma), *Ocotea pulchella* (Op) e *Xylopiya ochrantha* (Xo) foram testados por microdiluição contra os patógenos *Fusarium guttiforme*, *guttiforme*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* na concentração de 1×10^6 conídios/mL. Os óleos essenciais e o controle solvente de DMSO 5% (CS) foram testados nas concentrações: 30 µL/mL (C1), 15 µL /mL (C2), 7,5 µL/mL (C3) e 3,75 µL /mL (C4). O controle positivo de inibição usando dois antifúngicos, cetoconazol (Cet) e Itraconazol (Itr) foram testados nas concentrações 10 µg/mL (C1), 5 µg/mL(C2), 2,5 µg/mL (C3) e 1,25 µg/mL (C4). µL/mL. As microplacas foram reveladas com resazurina 0,01% após 72 h de incubação. A resazurina é um indicador redox que permite detectar a viabilidade celular por meio da mudança de cor roxo a rosa.

Quadro 3. Atividade fungicida de óleos essenciais sobre *A. niger*, *A. flavus* e *F. guttiforme*

Fungo fitopatogênico		<i>Fusarium guttiforme</i>									
T/c	Aa	Es	Ma	Op	Ps	Xo	Cet	itr	CS	B	
C1	Blue	Orange	Dark Blue	Orange	Orange	Dark Blue	Blue	Blue	Orange	Orange	
C2	Blue	Orange	Dark Blue	Yellow	Yellow	Orange	Blue	Blue	Orange	Orange	
C3	Blue	Orange	Orange	Yellow	Yellow	Orange	Blue	Blue	Orange	Orange	
C4	Orange	Orange	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Dark Blue	Orange	Orange	

Valor	Escala de avaliação antifúngica
Blue	Sem crescimento e sem atividade metabólica
Dark Blue	Sem crescimento e com atividade metabólica
Orange	Crescimento micelial
Yellow	Crescimento micelial e esporulação

Fungo fitopatogênico		<i>Aspergillus niger</i>									
T/c	Aa	Es	Ma	Op	Ps	Xo	Cet	itr	CS	B	
C1	Blue	Orange	Blue	Orange	Orange	Blue	Blue	Blue	Orange	Yellow	
C2	Blue	Yellow	Dark Blue	Yellow	Yellow	Dark Blue	Blue	Blue	Yellow	Yellow	
C3	Orange	Yellow	Dark Blue	Yellow	Yellow	Dark Blue	Blue	Dark Blue	Yellow	Yellow	
C4	Yellow	Yellow	Dark Blue	Yellow	Yellow	Dark Blue	Orange	Dark Blue	Yellow	Yellow	

Fungo fitopatogênico		<i>Aspergillus flavus</i>									
T/c	Aa	Es	Ma	Op	Ps	Xo	Cet	itr	CS	B	
C1	Blue	Orange	Dark Blue	Orange	Orange	Orange	Blue	Blue	Orange	Orange	
C2	Dark Blue	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Blue	Blue	Orange	Yellow	
C3	Orange	Yellow	Orange	Yellow	Yellow	Orange	Dark Blue	Blue	Orange	Yellow	
C4	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Yellow	Yellow	

Aa: óleo essencial de *Annona acutiflora*, Es: óleo essencial de *Eugenia sulcata*, Ma: óleo essencial de *Myrcia amazonica*, (Op): óleo essencial de *Ocotea pulchella* (Op), Xo: óleo essencial de *Xylopia ochrantha*, Cet: cetaconazol; itr: itraconazole; CS: controle de solvente; B: branco – crescimento fúngico normal. C1: 30 µL/mL, C2: 15 µL /mL, C3: 7,5 µL/mL (C3) e C4: 3,75 µL /mL.

Apêndice C

Metodologia inicial de revestimentos a base de fécula de mandioca

Os revestimentos foram preparados de adaptando procedimentos de Bashir *et al.* (2023) e Batista *et al.* (2020). Uma solução dispersante foi preparada à base de fécula de mandioca 2,25% (National Frigex Ingredient) em 300 mL de água milli-Q estéril sob agitação a 80 °C durante 12 min para atingir a gelatinização completa. Após resfriamento da solução a 40 °C, foi adicionado 0,75% de glicerol como plastificante e agitado por 30 min. Adicionou-se 10 g de micropartículas (ALG:GE) /100 mL de solução dispersante e se manteve em agitação magnética por 12 min a 30 °C. A solução dispersante foi homogeneizada no homogeneizador Ultra Turrax a temperatura ambiente por 5 min a 8000 rpm. Para esgotar as bolhas de ar produzidas durante a homogeneização, a emulsão foi deixada a temperatura ambiente por 15 min. A mistura resultante foi levada ao banho sonicador por 20 min para minimizar o tamanho das gotas.

Referências

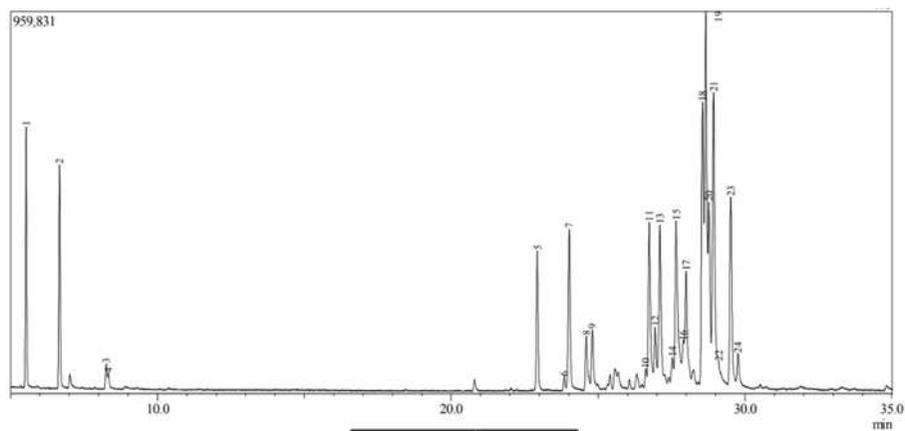
BASHIR, Omar, *et al.* Development, characterization and use of rosemary essential oil loaded water-chestnut starch based nanoemulsion coatings for enhancing post-harvest quality of apples var. Golden delicious. **Current Research in Food Science**, 2023, vol. 7, p. 100570.

Batista, D., V. S.; Reis, R. C., Almeida, J. M., Rezende, B., Bragança, C. A. D., & da Silva, F. Edible coatings in post-harvest papaya: impact on physical–chemical and sensory characteristics. **Journal of Food Science and Technology**, 2020, vol. 57, p. 274-281.

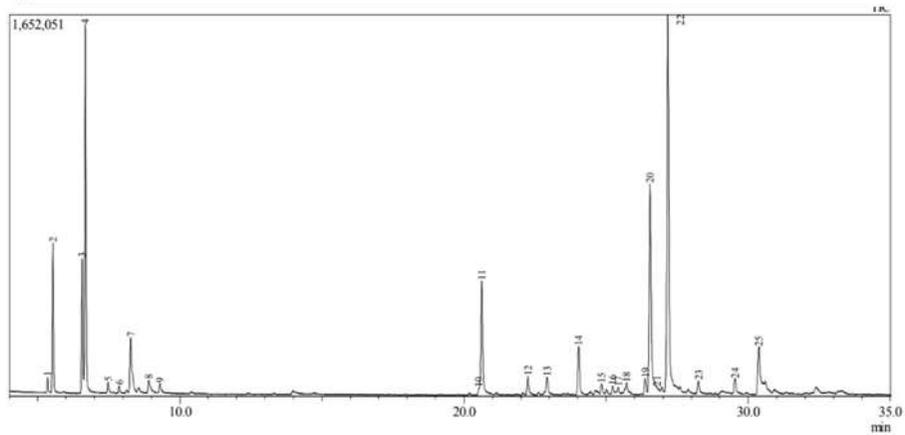
Apêndice D

Cromatograma da análise química dos óleos essenciais de *Annona acutiflora* (a) e *Xylopiya ochrantha* (b)

a)



b)



Apêndice E

Quadro E1 – Análises estatísticas dos dados de percentagem antifúngica dos óleos essenciais de *A. acutiflora* e *X. ochrantha* contra *T. ethacetica*

Tabela analisada	Atividade antifúngica dos óleos <i>A. acutiflora</i> e <i>X. ochrantha</i> contra <i>T. ethacetica</i>				
ANOVA bidirecional					
Alfa	0,05				
Fonte de variação	% da variação total	Valor P	Resumo do valor de P	Significativo?	
Interação	10,69	0,0448	*	Sim	
Concentração	17,90	0,0008	***	Sim	
Tratamento	45,83	<0,0001	****	Sim	
Tabela da ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	Valor P
Interação	2098	4	524,4	F (4, 27) = 2,819	P=0,0448
Concentração	3513	2	1756	F (2, 27) = 9,442	P=0,0008
Tratamento	8995	2	4497	F (2, 27) = 24,18	P<0,0001
Residual	5022	27	186,0		
Número de comparações por família	2				
Alfa	0,05				
Teste de comparações múltiplas de Dunnett	Diferenças de média	Intervalo de confiança de 95% da diferença,	Significativo?	Resumo	Valor P ajustado
DMSO vs. OEAA	-38,52	-51,52 to -25,53	Sim	****	<0,0001
DMSO vs. OEXO	-22,62	-35,61 to -9,627	Sim	***	0,0008
Número de comparações por família	2				
Alfa	0,05				

Quadro E2 - Análises estatísticas dos dados de percentagem antifúngica de nanoemulsões de óleos essenciais de *A. acutiflora* e *X. ochrantha contra T. ethacetica*

Table Analyzed	Atividade antifúngica das nanoemulsões contra <i>T. ethacetica</i>				
ANOVA bidirecional	Comum				
Alpha	0,05				
Fonte de variação	% da variação total	Valor P	Resumo do valor de P	Significativo?	
Interação	1,479	0,9300	ns	Não	
Concentração	1,522	0,6521	ns	Não	
Nanoemulsão	49,70	<0,0001	****	Sim	
Tabela da ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	Valor P
Interação	189,9	4	47,49	F (4, 27) = 0,2111	P=0,9300
Concentração	195,4	2	97,72	F (2, 27) = 0,4344	P=0,6521
Nanoemulsão	6383	2	3191	F (2, 27) = 14,19	P<0,0001
Residual	6074	27	224,9		
Comparar as médias das colunas (efeito da coluna principal)					
Número de famílias	1				
Número de comparações por família	2				
Alfa	0,05				
Teste de comparações múltiplas de Dunnett	Diferenças de média	Intervalo de confiança de 95% da diferença,	Significativo?	Resumo	Valor P ajustado

B-NE vs. NE OEAA	-30,51	-44,80 to -16,22	Sim	****	<0,0001
B-NE vs. NE OEXO	-25,24	-39,53 to -10,95	Sim	***	0,0006

Quadro E3 - Análises estatísticas do ensaio micelial testando as emulsões contra *T. ethacetica*.

Teste de Kruskal-Wallis				
Valor de P	0,025			
Valor P exato ou aproximado?	Exato			
Resumo do valor P	*			
As medianas variam de forma significativa? (P < 0.05)?	Sim			
Número de grupos	3			
Estatística de Kruskal-Wallis	6,161			
Resumo dos dados				
Número de tratamentos (colunas)	3			
Número de valores (total)	9			
Teste de distribuição normal				
Teste de Shapiro-Wilk				
W	0,7791	0,8032	Invalid input data	
Valor de p	0,0656	0,1222		
Passou no teste de normalidade (alfa=0,05)?	Sim	Sim		
Resumo do valor P	ns	ns		
Número de valores	3	3	3	
Número de famílias	1			
Número de comparações por família	3			
Alfa	0,05			

Teste de comparações múltiplas de Dunn	Diferença de classificação média	Significativo?	Resumo	Valor P ajustado
E-AaCin vs. E-Cin	-1,667	Não	ns	>0,9999
E-AaCin vs. Cin-p	-5,333	Sim	*	0,0458
E-Cin vs. Cin-p	-3,667	Não	ns	0,2861

Apêndice F

Quadro F1 – Análises estatísticas dos dados da microbiota fúngica em bananas

Teste ANOVA de Brown-Forsythe					
F* (DFn, DFd)		152,0 (3,000, 1,614)			
Valor de P		0,0148			
Resumo do valor de P		*			
Diferença significativa entre as médias (P < 0,05)?		Sim			
Teste ANOVA de Welch					
W (DFn, DFd)		106,1 (3,000, 1,941)			
Valor de P		0,0105			
Resumo do valor de p		*			
Diferença significativa entre as médias (P < 0,05)?		Sim			
Número de famílias		1			
Número de comparações por família		3			
Alfa		0,05			
Teste de comparações múltiplas de Dunnett	Diferenças de média	Intervalo de confiança de 95% da diferença,	Significativo?	Resumo	Valor P ajustado
Grupo 4 vs. Grupo 1	-0,3389	-6,518 to 5,840	Não	ns	0,9982
Grupo 4 vs. Grupo 2	2,051	-4,128 to 8,230	Não	ns	0,7518
Grupo 4 vs. Grupo 3	-2,014	-8,193 to 4,164	Não	ns	0,7612

*SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: Soma média dos quadrados; ns: não significativo ($p < 0,05$).

Apêndice G

Análise estatística da cor instrumental de bananas tratadas com emulsões.

Quadro G1 – ANOVA bidirecional e comparações múltiplas de dados de coordenadas L* de banana

ANOVA bidirecional	Comum	Quadro 1: Cor_L*_Banana			
Alfa	0,05				
Fonte de variação	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interação	1,624	0,7903	ns	Não	
Tempo de estocagem	42,76	<0,0001	****	Sim	
Grupo	2,632	0,1737	ns	Não	
Tabela ANOVA	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interação	96,72	6	16,12	F (6, 96) = 0,5221	P=0,7903
Tempo de estocagem	2547	2	1273	F (2, 96) = 41,25	P<0,0001
Grupo	156,8	3	52,26	F (3, 96) = 1,693	P=0,1737
Resíduo	2964	96	30,87		
Nome do teste de normalidade	Estatísticas	Valor P	Passou no teste de normalidade (alfa=0,05)?	Resumo do valor P	
Anderson-Darling (A2*)	0,732	0,0548	Sim	ns	
Comparações múltiplas: Dentro de cada linha, compare as colunas (efeitos simples dentro das linhas)					
Teste de comparações múltiplas de Dunnett	Diferenças de média	Intervalo de confiança de 95% da diferença	Significativo?	Resumo	Valor P ajustado
<i>Dia 0</i>					
Grupo 4 vs. Grupo 1	3,977	-2,787 to 10,74	Não	ns	0,346
Grupo 4 vs. Grupo 2	1,651	-5,113 to 8,415	Não	ns	0,8721
Grupo 4 vs. Grupo 3	1,999	-4,765 to 8,763	Não	ns	0,8

Dia 5						
Grupo 4 vs. Grupo 1	2,049	-4,715 to 8,813	Não	ns	0,7888	
Grupo 4 vs. Grupo 2	0,2217	-6,542 to 6,986	Não	ns	0,9996	
Grupo 4 vs. Grupo 3	1,553	-5,211 to 8,317	Não	ns	0,8901	
Dia 10						
Grupo 4 vs. Grupo 1	2,528	-4,236 to 9,292	Não	ns	0,6743	
Grupo 4 vs. Grupo 2	1,598	-5,166 to 8,362	Não	ns	0,8819	
Grupo 4 vs. Grupo 3	5,986	-0,7775 to 12,75	Não	ns	0,093	

*SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: Soma média dos quadrados; ns: não significativo ($p < 0,05$).

Quadro G2 – ANOVA bidirecional e comparações múltiplas de dados de coordenadas a* de banana

ANOVA bidirecional	Comum		Quadro 1: Cor_a*_Banana		
Alfa	0,05				
Fonte de variação	% da variação total	Valor P	Resumo do valor de P	Significativo?	
Interação	0,2019	0,925	ns	Não	
Tempo de estocagem	84,41	<0,0001	****	Sim	
Grupos	0,07329	0,8735	ns	Não	
Tabela ANOVA	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	Valor P
Interação	14,54	6	2,423	F (6, 96) = 0,3203	P=0,9250
Tempo de estocagem	6080	2	3040	F (2, 96) = 401,7	P<0,0001
Grupos	5,278	3	1,759	F (3, 96) = 0,2325	P=0,8735

Residual	726,4	96	7,567			
Comparações múltiplas: Dentro de cada linha, compara as colunas (efeitos simples dentro das linhas)						
Número de famílias		3				
Número de comparações por família		3				
Alfa		0,05				
Teste de comparações múltiplas de Dunnett	Diferenças de média	Intervalo de confiança de 95% da diferença	Significativo?	Resumo	Valor P ajustado	
Dia 0						
Grupo 4 vs. Grupo 1	0,824	-2,525 to 4,173	Não	ns	0,8696	
Grupo 4 vs. Grupo 2	1,091	-2,258 to 4,440	Não	ns	0,7529	
Grupo 4 vs. Grupo 3	0,283	-3,066 to 3,632	Não	ns	0,993	
Dia 5						
Grupo 4 vs. Grupo 1	-0,614	-3,963 to 2,735	Não	ns	0,9384	
Grupo 4 vs. Grupo 2	0,049	-3,300 to 3,398	Não	ns	>0,9999	
Grupo 4 vs. Grupo 3	0,158	-3,191 to 3,507	Não	ns	0,9988	
Dia 10						
Grupo 4 vs. Grupo 1	-0,114	-3,463 to 3,235	Não	ns	0,9995	
Grupo 4 vs. Grupo 2	-0,228	-3,577 to 3,121	Não	ns	0,9963	
Grupo 4 vs. Grupo 3	-1,306	-4,655 to 2,043	Não	ns	0,6472	

*SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: Soma média dos quadrados; ns: não significativo ($p < 0,05$).

Quadro G3 – ANOVA bidirecional e comparações múltiplas de dados de coordenadas b* de banana

ANOVA bidirecional	Comum		Tabela analisada	Cor_b*_banana		
--------------------	-------	--	------------------	---------------	--	--

Alfa	0,05					
Fonte de variação	% da variação total	Valor P	Resumo do valor de P	Significativo?		
Interação	1,932	0,8751	ns	Não		
Tempo de estocagem	19,43	<0,0001	****	Sim		
Grupo	1,298	0,6545	ns	Não		
Tabela ANOVA	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
Interação	147,9	6	24,65	F (6, 96) = 0,4035	P=0,8751	
Tempo de estocagem	1488	2	744	F (2, 96) = 12,18	P<0,0001	
Grupo	99,4	3	33,13	F (3, 96) = 0,5423	P=0,6545	
Residual	5866	96	61,1			
Comparações múltiplas: Dentro de cada linha, compara as colunas (efeitos simples dentro das linhas)						
Teste de comparações múltiplas de Dunnett	Diferenças de média	Intervalo de confiança de 95% da diferença	Significativo?	Resumo	Valor P ajustado	
Dia 0						
Grupo 4 vs. Grupo 1	3,029	-6,487 to 12,54	Não	ns	0,7648	
Grupo 4 vs. Grupo 2	7,017	-2,499 to 16,53	Não	ns	0,1884	
Grupo 4 vs. Grupo 3	2,81	-6,706 to 12,33	Não	ns	0,8004	
Dia 5						
Grupo 4 vs. Grupo 1	2,047	-7,469 to 11,56	Não	ns	0,9067	
Grupo 4 vs. Grupo 2	0,577	-8,939 to 10,09	Não	ns	0,9974	
Grupo 4 vs. Grupo 3	1,674	-7,842 to 11,19	Não	ns	0,9449	

Dia 10						
Grupo 4 vs. Grupo 1	1,915	-7,601 to 11,43	Não	ns	0,9214	
Grupo 4 vs. Grupo 2	0,837	-8,679 to 10,35	Não	ns	0,9922	
Grupo 4 vs. Grupo 3	0,084	-9,432 to 9,600	Não	ns	>0,9999	

*SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: Soma média dos quadrados; ns: não significativo ($p < 0,05$)

Quadro G4 - ANOVA bidirecional e comparações múltiplas de dados do croma C* das bananas

ANOVA bidirecional	Comum		Alfa	0,05		
Fonte de variação	% da variação total	Valor P	Resumo do valor de P	Significativo?		
Interação	2,062	0,8639	ns	Não		
Tempo de estocagem	17,37	<0,0001	****	Sim		
Grupo	1,29	0,6655	ns	Não		
Tabela ANOVA	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
Interação	154,7	6	25,78	F (6, 96) = 0,4203	P=0,8639	
Tempo de estocagem	1303	2	651,6	F (2, 96) = 10,62	P<0,0001	
Grupo	96,77	3	32,26	F (3, 96) = 0,5259	P=0,6655	
Residual	5889	96	61,34			
Normalidade de residuais						
Nome do teste	Estatística	Valor P	Passou no teste de normalidade (alfa=0,05)?	Resumo do valor p		
Anderson-Darling (A2*)	0,6148	0,1071	Sim	ns		
Comparações múltiplas: Dentro de cada linha, compare as colunas (efeitos simples dentro das linhas)						

Teste de comparações múltiplas de Dunnett		Diferenças de média	Intervalo de confiança de 95% da diferença	Significativo?	Resumo	Valor P ajustado
Dia 0						
Grupo 4 vs. Grupo 1		2,886	-6,648 to 12,42	Não	ns	0,7891
Grupo 4 vs. Grupo 2		7,06	-2,474 to 16,59	Não	ns	0,1859
Grupo 4 vs. Grupo 3		2,92	-6,614 to 12,45	Não	ns	0,7836
Dia 5						
Grupo 4 vs. Grupo 1		1,901	-7,633 to 11,43	Não	ns	0,9233
Grupo 4 vs. Grupo 2		0,561	-8,973 to 10,09	Não	ns	0,9976
Grupo 4 vs. Grupo 3		1,673	-7,861 to 11,21	Não	ns	0,9453
Dia 10						
Grupo 4 vs. Grupo 1		1,85	-7,684 to 11,38	Não	ns	0,9285
Grupo 4 vs. Grupo 2		0,7737	-8,760 to 10,31	Não	ns	0,9938
Grupo 4 vs. Grupo 3		-0,2133	-9,747 to 9,321	Não	ns	>0,9999

*SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: Soma média dos quadrados; ns: não significativo ($p < 0,05$)

Quadro G5 – ANOVA bidirecional e comparações múltiplas de dados da tonalidade °Hue das bananas

ANOVA bidirecional	Comum			Cor_Hue_bananas		
Alfa	0,05					
Fonte de variação	% da variação total	Valor P	Resumo do valor de P	Significativo?		
Interação	1,894	0,2145	ns	Não		

Tempo de estocagem	71,52	<0,0001	****	Sim		
Grupos	0,9469	0,2414	ns	Não		
ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
Interação	33,54	6	5,59	F (6, 96) = 1,421	P=0,2145	
Tempo de estocagem	1267	2	633,4	F (2, 96) = 161,0	P<0,0001	
Grupos	16,77	3	5,59	F (3, 96) = 1,421	P=0,2414	
Residual	377,6	96	3,934			
Comparações múltiplas: Dentro de cada linha, compare as colunas (efeitos simples dentro das linhas)						
Teste de comparações múltiplas de Dunnett	Diferenças de média	de	Intervalo de confiança de 95% da diferença	Significativo?	Resumo	Valor P ajustado
Dia 0						
Grupo 4 vs. Grupo 1	1,55		-0,8647 to 3,964	Não	ns	0,2814
Grupo 4 vs. Grupo 2	0,06067		-2,354 to 2,475	Não	ns	0,9999
Grupo 4 vs. Grupo 3	-1,197		-3,612 to 1,217	Não	ns	0,4758
Dia 5						
Grupo 4 vs. Grupo 1	0,9297		-1,485 to 3,344	Não	ns	0,6555
Grupo 4 vs. Grupo 2	0,1857		-2,229 to 2,600	Não	ns	0,9947
Grupo 4 vs. Grupo 3	0,1717		-2,243 to 2,586	Não	ns	0,9958
Dia 10						
Grupo 4 vs. Grupo 1	0,413		-2,001 to 2,827	Não	ns	0,9489
Grupo 4 vs. Grupo 2	0,258		-2,156 to 2,672	Não	ns	0,9864
Grupo 4 vs. Grupo 3	1,248		-1,166 to 3,662	Não	ns	0,4442

*SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: Soma média dos quadrados; ns: não significativo ($p < 0,05$)

Quadro G6 - ANOVA bidirecional de dados da diferença total de cor das bananas

Resumo da ANOVA						
F	0,8873					
Valor de P	0,4582					
Resumo do valor de P	ns					
Diferença significativa entre as médias ($P < 0,05$)?	Não					
Quadrado R	0,07679					
Brown-Forsythe test						
F (DFn, DFd)	0,8426 (3, 32)					
Valor de P	0,4807					
Resumo do valor de P	ns					
Os DPs são significativamente diferentes ($P < 0,05$)?	Não					
Bartlett's test						
Estatística de Bartlett (corrigida)	2,754					
Valor de P	0,4312					
Resumo do valor P	ns					
Os DPs são significativamente diferentes ($P < 0,05$)?	Não					
Tabela ANOVA						
	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
Tratamento (entre colunas)	75,21	3	25,07	F (3, 32) = 0,8873	P=0,4582	
Residual (dentro das colunas)	904,2	32	28,26			

Total	979,4	35				
Normalidade dos resíduos						
Nome do teste	Estatística	Valor P	Passou no teste de normalidade (alfa=0,05)?	Resumo do P valor		
Anderson-Darling (A2*)	0,2556	0,7068	Sim	ns		
D'Agostino-Pearson omnibus (K2)	0,8353	0,6586	Sim	ns		
Shapiro-Wilk (W)	0,9808	0,7732	Sim	ns		
Kolmogorov-Smirnov (distance)	0,1114	0,1	Sim	ns		

*SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: Soma média dos quadrados; ns: não significativo ($p < 0,05$).

Quadro H1 - Análise estatística de dados da textura da banana pelo ensaio de punção

Teste de distribuição normal					
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	
Teste de Shapiro-Wilk					
W	0,8975	0,9142	0,8388	0,8777	
Valor de p	0,3777	0,4324	0,2109	0,3176	
Passou no teste de normalidade (alfa=0,05)?	Sim	Sim	Sim	Sim	
Resumo do valor de P	ns	ns	ns	ns	
Tabela analisada	Textura_Banana				
ANOVA bidirecional	Comum				
Alfa	0,05				
Fonte de variação	% da variação total	P valor	Resumo do valor P	Significativo?	
Interação	0,4239	0,4333	ns	Não	
Tempo de estocagem	84,74	<0,0001	****	Sim	
Grupo de banana	0,278	0,2761	ns	Não	
Tabela ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interação	143,6	6	23,93	F (6, 204) = 0,9897	P=0,4333
Tempo de estocagem	28702	2	14351	F (2, 204) = 593,5	P<0,0001

Grupo de bananas	94,18	3	31,39	F (3, 204) = 1,298	P=0,2761	
Residual	4933	204	24,18			
Número de famílias	3					
Número de comparações por família	3					
Alfa	0,05					
Teste de comparações múltiplas de Dunnett						
	Diferenças de média	de	Intervalo de confiança de 95% da diferença	Significativo?	Resumo	Valor P ajustado
Dia 0						
Grupo 4 vs. Grupo 1	-3,53		-7,409 to 0,3497	Não	ns	0,0835
Grupo 4 vs. Grupo 2	-2,691		-6,571 to 1,188	Não	ns	0,2405
Grupo 4 vs. Grupo 3	-0,8739		-4,753 to 3,006	Não	ns	0,9112
Dia 5						
Grupo 4 vs. Grupo 1	-1,247		-5,126 to 2,632	Não	ns	0,7877
Grupo 4 vs. Grupo 2	-2,201		-6,080 to 1,679	Não	ns	0,3967
Grupo 4 vs. Grupo 3	0,01202		-3,867 to 3,891	Não	ns	>0,9999
Dia 10						
Grupo 4 vs. Grupo 1	0,322		-3,557 to 4,201	Não	ns	0,9947
Grupo 4 vs. Grupo 2	-0,1449		-4,024 to 3,735	Não	ns	0,9995
Grupo 4 vs. Grupo 3	-1,476		-5,355 to 2,404	Não	ns	0,6948

*SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: Soma média dos quadrados; ns: não significativo ($p < 0,05$).

Quadro H2 - Análise estatística de dados da diferença inicial e final da textura da banana pelo ensaio de punção

Test for normal distribution					
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	
Teste de Anderson-Darling					
A2*	1,394	0,3132	0,2577	0,2456	
Valor de p	0,0009	0,517	0,6771	0,7198	
Passou no teste de normalidade (alfa=0,05)?	Não	Sim	Sim	Sim	
Resumo do valor P	***	ns	ns	ns	
Teste de Shapiro-Wilk					
W	0,7897	0,9472	0,9655	0,9701	
Valor de p	0,0011	0,3835	0,7108	0,8001	
Passou no teste de normalidade (alfa=0,05)?	Não	Sim	Sim	Sim	
Resumo do valor P	**	ns	ns	ns	
Número de valores	18	18	18	18	
Tabela analisada					
Tabela analisada			Diferencial de textura de bananas		
Teste de Kruskal-Wallis					
Valor de P			0,032		
Valor P exato ou aproximado?			Approximate		

Resumo do valor P	*				
As medianas variam de forma significativa? (P < 0.05)?	Sim				
Número de grupos	4				
Estatística de Kruskal-Wallis	8,806				
Resumo dos dados					
Número de tratamentos (colunas)	4				
Número de valores (total)	72				
Resumo dos dados					
Número de famílias	1				
Número de comparações por família	3				
Alfa	0,05				
Resumo dos dados					
Teste de comparações múltiplas de Dunn	Diferença média de classificação	Significativo?	Resumo	Valor P ajustado	
Grupo 4 vs. Grupo 1	-9,389	Não	ns	0,5347	
Grupo 4 vs. Grupo 2	0,5556	Não	ns	>0,9999	
Grupo 4 vs. Grupo 3	11,28	Não	ns	0,3176	

Apêndice I

Quadro I1 - Análise estatística de dados da variação dos sólidos solúveis totais das bananas tratadas com emulsões

Teste de Kruskal-Wallis	
Valor de P	0,2020
Valor P exato ou aproximado?	aproximado
Resumo do valor P	ns
As medianas variam de forma significativa? ($P < 0.05$)?	Não
Número de grupos	4
Estatística de Kruskal-Wallis	4,618
Resumo dos dados	
Número de tratamentos (colunas)	4
Número de valores (total)	36

Apêndice J

Quadro J1 - Análise estatística de dados da variação do pH da polpa das bananas tratadas com emulsão

ANOVA bidirecional	Comum				
Alfa	0,05				
Fonte de variação	% da variação total	P valor	Resumo do valor P	Significativo?	
Interação	4,106	0,4778	ns	Não	
Tempo de estocagem	20,09	<0,0001	****	Sim	
Grupo de bananas	5,087	0,0820	ns	Não	
Tabela ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interação	0,5618	6	0,09363	F (6, 96) = 0,9290	P=0,4778
Tempo de estocagem	2,748	2	1,374	F (2, 96) = 13,63	P<0,0001
Grupo da banana	0,6960	3	0,2320	F (3, 96) = 2,302	P=0,0820
Resíduo	9,675	96	0,1008		
Em cada linha, compare as colunas (efeitos simples dentro das linhas)					
Número de famílias	3				
Número de comparações por família	3				
Alfa	0,05				
Teste de comparações múltiplas de Dunnett	Diferenças de média	Intervalo de confiança de 95% da diferença	Significativo?	Resumo	Valor P ajustado
Dia 0					
Grupo 4 vs. Grupo 1	0,004444	-0,3528 to 0,3617	Não	ns	>0,9999
Grupo 4 vs. Grupo2	-0,2267	-0,5839 to 0,1305	Não	ns	0,3038
Grupo 4 vs. Grupo 3	-0,06000	-0,4172 to 0,2972	Não	ns	0,9587
Dia 5					

Grupo 4 vs. Grupo 1	-0,07333	-0,4305 to 0,2839	Não	ns	0,9287
Grupo 4 vs. Grupo2	-0,05222	-0,4094 to 0,3050	Não	ns	0,9720
Grupo 4 vs. Grupo 3	-0,1256	-0,4828 to 0,2317	Não	ns	0,7370
Dia 10					
Grupo 4 vs. Grupo 1	-0,3778	-0,7350 to -0,02056	Sim	*	0,0355
Grupo 4 vs. Grupo2	-0,3833	-0,7405 to -0,02612	Sim	*	0,0322
Grupo 4 vs. Grupo 3	-0,2556	-0,6128 to 0,1017	Não	ns	0,2160

*SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: Soma média dos quadrados; ns: não significativo ($p < 0,05$).

Quadro K1 – Análise estatística de dados da variação da acidez titulável da polpa das bananas tratadas com emulsão

ANOVA bidirecional					
Alfa	0,05				
Fonte de variação	% da variação total	P valor	Resumo do valor P	Significativo?	
Interação	7,927	0,0018	**	Sim	
Tempo de estocagem	56,59	<0,0001	****	Sim	
Grupo da banana	2,403	0,0797	ns	Não	
Tabela ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	Valor P
Interação	0,2358	6	0,03931	F (6, 96) = 3,835	P=0,0018
Tempo de estocagem	1,684	2	0,8419	F (2, 96) = 82,13	P<0,0001
Grupo da banana	0,07149	3	0,02383	F (3, 96) = 2,325	P=0,0797
Resíduo	0,9840	96	0,01025		
Teste de comparações múltiplas de Dunnett	Diferenças de média	Intervalo de confiança de 95% da diferença	Significativo?	Resumo	Valor P ajustado
Dia 0					
Grupo 4 vs. Grupo 1	-0,2477	-0,3616 to -0,1337	Sim	****	<0,0001
Grupo 4 vs. Grupo 2	-0,1208	-0,2347 to -0,006861	Sim	*	0,0349
Grupo 4 vs. Grupo 3	-0,1056	-0,2195 to 0,008362	Não	ns	0,0758
Dia 5					
Grupo 4 vs. Grupo 1	0,03333	-0,08058 to 0,1473	Não	ns	0,8259
Grupo 4 vs. Grupo 2	-0,04622	-0,1601 to 0,06769	Não	ns	0,6482
Grupo 4 vs. Grupo 3	-0,0008889	-0,1148 to 0,1130	Não	ns	>0,9999

Dia 10					
Grupo 4 vs. Grupo 1	0,009556	-0,1044 to 0,1235	Não	ns	0,9944
Grupo 4 vs. Grupo 2	0,003111	-0,1108 to 0,1170	Não	ns	0,9999
Grupo 4 vs. Grupo 3	0,004889	-0,1090 to 0,1188	Não	ns	0,9992

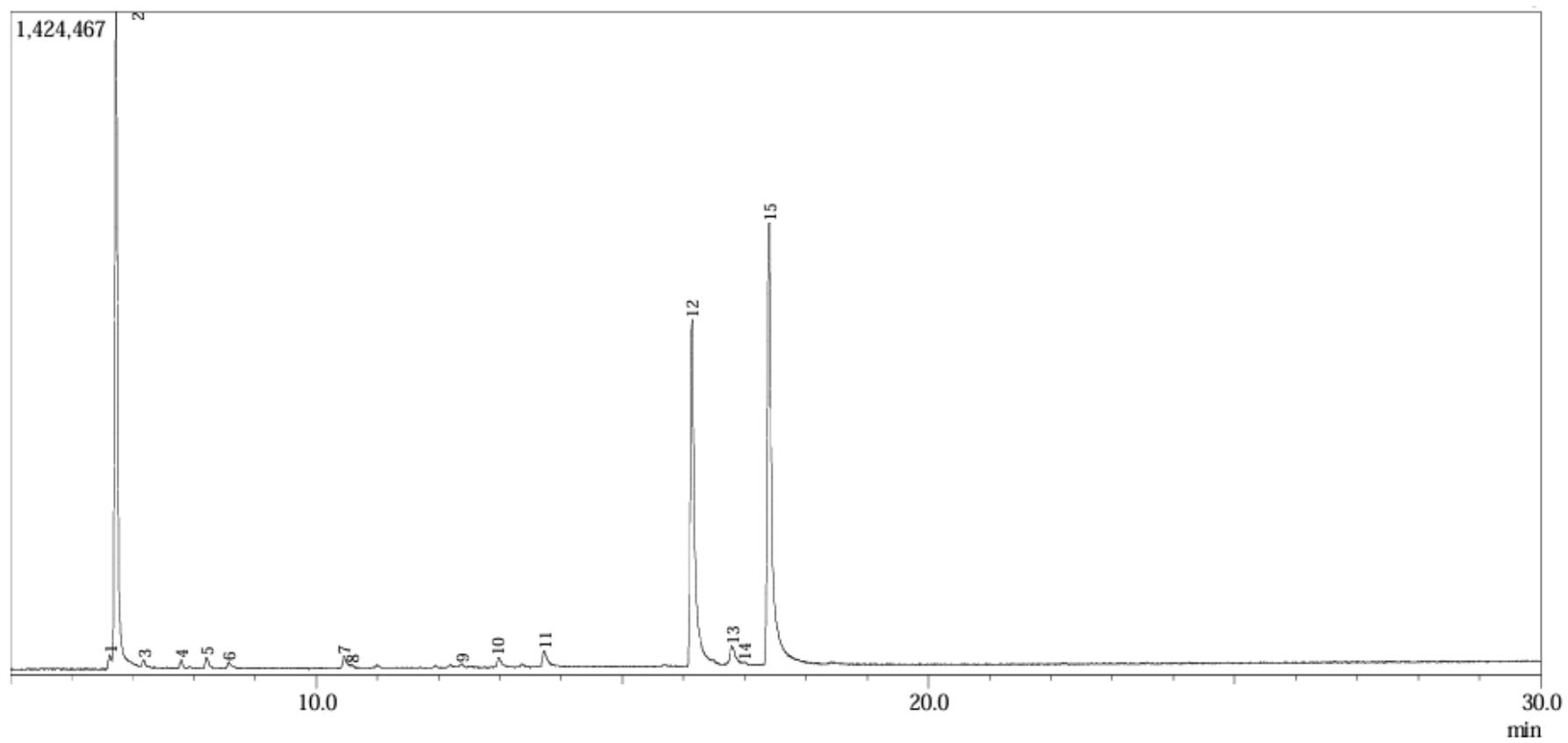
*SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: Soma média dos quadrados; ns: não significativo ($p < 0,05$).

Quadro L1 – Análise estatística de dados do índice de maturação das bananas tratadas com emulsão

ANOVA bidirecional					
Alfa	0,05				
Fonte de variação	% da variação total	P valor	Resumo do valor P	Significativo?	
Interação	3,552	0,0952	ns	Não	
Tempo de estocagem	64,29	<0,0001	****	Sim	
Grupo da banana	1,638	0,1686	ns	Não	
Tabela ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	Valor P
Interação	881,6	6	146,9	F (6, 96) = 1,862	P=0,0952
Tempo de estocagem	15955	2	7978	F (2, 96) = 101,1	P<0,0001
Grupo da banana	406,4	3	135,5	F (3, 96) = 1,717	P=0,1686
Resíduo	7575	96	78,91		

*SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: Soma média dos quadrados; ns: não significativo ($p < 0,05$).

Figura M1: Cromatograma da análise química por CG-EM/DIC do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*



Apêndice N

Quadro N1: Área sob a curva da progressão da doença (AACPD) pinta preta em tomate causada artificialmente com esporos do fungo *Alternaria alternata*.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Linha de base	0	0	0	0	0
Área total	128,1	119,7	217,6	193,6	169,6
Erro padrão	6,348	10,33	25,69	21,84	13,60
Intervalo de confiança de 95%	115,6 to 140,5	99,48 to 140,0	167,2 to 267,9	150,8 to 236,4	143,0 to 196,3
Área de pico total	128,1	119,7	217,6	193,6	169,6
Erro padrão	6,348	10,33	25,69	21,84	13,60
Intervalo de confiança de 95%	115,6 to 140,5	99,48 to 140,0	167,2 to 267,9	150,8 to 236,4	143,0 to 196,3
Número de picos	1	1	1	1	1
Pico 1					
Primeiro X	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Último X	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
Pico X	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
Pico Y	15,77	14,31	35,10	22,93	21,58
Área	128,1	119,7	217,6	193,6	169,6
Erro padrão	6,348	10,33	25,69	21,84	13,60
Intervalo de confiança de 95%	115,6 to 140,5	99,48 to 140,0	167,2 to 267,9	150,8 to 236,4	143,0 to 196,3
%Área	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Apêndice O

Quadro O1: Análise estatística de dados da perda de peso de tomates revestidos

Teste de Shapiro-Wilk	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 3	Grupo 5
W	0,7762	0,9635	0,7717	0,9682	0,8060
Valor de p	0,0355	0,8319	0,0322	0,8798	0,0666
Passou no teste de normalidade (alfa=0,05)?	Nao	Sim	Nao	Sim	Sim
Resumo do valor P	*	ns	*	ns	ns
Teste Kruskal-Wallis					
Valor de P			0,7113		
Valor P exato ou aproximado?			Aproximado		
Resumo do valor P			ns		
As medianas variam de forma significativa? (P < 0.05)?			Nao		
Número de grupos			5		
Estatística de Kruskal-Wallis			2,133		

Quadro P1: ANOVA bidirecional e comparações múltiplas de dados de coordenadas L* de tomates revestidos independentes durante armazenamento

ANOVA bidirecional					
Alfa	0,05				
Fonte de variação	% da variação total	P valor	Resumo do valor P	Significativo?	
Interação	14,28	0,0002	***	Sim	
Tempo de estocagem	27,01	<0,0001	****	Sim	
Grupo de tomates/revestimento	2,647	0,1150	ns	Não	
Tabela ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interação	761,7	12	63,47	F (12, 160) = 3,395	P=0,0002
Tempo de estocagem	1441	3	480,2	F (3, 160) = 25,69	P<0,0001
Grupos	141,2	4	35,30	F (4, 160) = 1,888	P=0,1150
Resíduo	2991	160	18,69		

*SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: Soma média dos quadrados; ns: não significativo ($p < 0,05$).

Quadro P2: ANOVA bidirecional e comparações múltiplas de dados de coordenadas a* de tomates revestidos independentes durante armazenamento

ANOVA bidirecional					
Alfa	0,05				
Fonte de variação	% da variação total	P valor	Resumo do valor P	Significativo?	
Interação	6,317	0,0063	**	Sim	
Tempo de estocagem	54,81	<0,0001	****	Sim	
Grupo de tomates/revestimento	4,233	0,0010	***	Sim	
Tabela ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value

Interação	1855	12	154,6	F (12, 160) = 2,431	P=0,0063
Tempo de estocagem	16095	3	5365	F (3, 160) = 84,39	P<0,0001
Grupo de tomates /revestimento	1243	4	310,7	F (4, 160) = 4,888	P=0,0010
Resíduo	10172	160	63,58		
Teste de comparações múltiplas de Dunnett					
	Diferenças de média	Intervalo de confiança de 95% da diferença	Significativo?	Resumo	Valor P ajustado
Dia 0					
Grupo 5 vs. Grupo 1	0,000	-9,271 to 9,271	Não	ns	>0,9999
Grupo 5 vs. Grupo 2	-0,3667	-9,638 to 8,904	Não	ns	0,9999
Grupo 5 vs. Grupo 3	0,9667	-8,304 to 10,24	Não	ns	0,9970
Grupo 5 vs. Grupo 4	1,333	-7,938 to 10,60	Não	ns	0,9899
Dia 3					
Grupo 5 vs. Grupo 1	-0,6444	-9,916 to 8,627	Não	ns	0,9992
Grupo 5 vs. Grupo 2	6,933	-2,338 to 16,20	Não	ns	0,2015
Grupo 5 vs. Grupo 3	8,478	-0,7934 to 17,75	Não	ns	0,0836
Grupo 5 vs. Grupo 4	6,389	-2,882 to 15,66	Não	ns	0,2643
Dia 6					
Grupo 5 vs. Grupo 1	6,189	-3,082 to 15,46	Não	ns	0,2906
Grupo 5 vs. Grupo 2	2,400	-6,871 to 11,67	Não	ns	0,9196
Grupo 5 vs. Grupo 3	-4,978	-14,25 to 4,293	Não	ns	0,4828

Grupo 5 vs. Grupo 4	5,656	-3,616 to 14,93	Não	ns	0,3684
Dia 9					
Grupo 5 vs. Grupo 1	11,32	2,051 to 20,59	Sim	*	0,0110
Grupo 5 vs. Grupo 2	11,29	2,018 to 20,56	Sim	*	0,0113
Grupo 5 vs. Grupo 3	6,667	-2,604 to 15,94	Não	ns	0,2308
Grupo 5 vs. Grupo 4	18,56	9,284 to 27,83	Sim	****	<0,0001

*SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: Soma média dos quadrados; ns: não significativo ($p < 0,05$).

Quadro P3: ANOVA bidirecional e comparações múltiplas de dados de coordenadas b* de tomates revestidos independentes durante armazenamento

ANOVA bidirecional					
Alfa	0,05				
Fonte de variação	% da variação total	P valor	Resumo do valor P	Significativo?	
Interação	4,592	0,4125	ns	Não	
Tempo de estocagem	34,89	<0,0001	****	Sim	
Grupo de tomates/revestimento	1,809	0,2992	ns	Não	
Tabela ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interação	217,0	12	18,08	F (12, 160) = 1,043	P=0,4125
Tempo de estocagem	1648	3	549,4	F (3, 160) = 31,69	P<0,0001
Grupo	85,48	4	21,37	F (4, 160) = 1,233	P=0,2992
Resíduo	2774	160	17,34		

Apêndice Q

Quadro Q1: ANOVA bidirecional e comparações múltiplas de dados de textura de tomates revestidos independentes durante armazenamento

ANOVA bidirecional					
Alfa	0,05				
Fonte de variação	% da variação total	P valor	Resumo do valor P	Significativo?	
Interação	7,406	0,0013	**	Sim	
Tempo de estocagem	14,69	<0,0001	****	Sim	
Grupo de tomates	3,362	0,0051	**	Sim	
Tabela ANOVA	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interação	316,3	12	26,35	F (12, 334) = 2,769	P=0,0013
Tempo de estocagem	627,3	3	209,1	F (3, 334) = 21,97	P<0,0001
Grupo de tomates/revestimento	143,6	4	35,89	F (4, 334) = 3,771	P=0,0051
Resíduo	3179	334	9,518		
Teste de comparações múltiplas de Dunnett	Diferenças de média	Intervalo de confiança de 95% da diferença	Significativo?	Resumo	Valor P ajustado
Dia 0					
Grupo 5 vs. Grupo 1	0,5550	-2,273 to 3,383	Não	ns	0,9703
Grupo 5 vs. Grupo 2	0,1167	-2,412 to 2,646	Não	ns	0,9998
Grupo 5 vs. Grupo 3	-0,9722	-3,501 to 1,557	Não	ns	0,7556

Grupo 5 vs. Grupo 4	1,062	-1,467 to 3,591	Não	ns	0,6958
Dia 3					
Grupo 5 vs. Grupo 1	0,2010	-2,322 to 2,724	Não	ns	0,9989
Grupo 5 vs. Grupo 2	-0,4556	-2,979 to 2,068	Não	ns	0,9772
Grupo 5 vs. Grupo 3	-0,7669	-3,290 to 1,756	Não	ns	0,8699
Grupo 5 vs. Grupo 4	-0,4833	-3,007 to 2,040	Não	ns	0,9717
Dia 6					
Grupo 5 vs. Grupo 1	-0,2825	-2,806 to 2,241	Não	ns	0,9961
Grupo 5 vs. Grupo 2	-0,3567	-2,880 to 2,167	Não	ns	0,9907
Grupo 5 vs. Grupo 3	0,7751	-1,748 to 3,298	Não	ns	0,8657
Grupo 5 vs. Grupo 4	-0,5033	-3,027 to 2,020	Não	ns	0,9675
Dia 9					
Grupo 5 vs. Grupo 1	-0,7408	-3,264 to 1,783	Não	ns	0,8828
Grupo 5 vs. Grupo 2	-3,396	-5,920 to -0,8728	Sim	**	0,0040
Grupo 5 vs. Grupo 3	-5,914	-8,437 to -3,390	Sim	****	<0,0001
Grupo 5 vs. Grupo 4	-2,622	-5,145 to -0,09836	Sim	*	0,0389

*SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: Soma média dos quadrados; ns: não significativo ($p < 0,05$).

Apêndice R

Quadro R1: ANOVA bidirecional e comparações múltiplas de dados do pH da polpa de tomates revestidos independentes durante seu armazenamento

	% da variação total	P valor	Resumo do valor P	Significativo?	
Fonte de variação	16,99	<0,0001	****	Sim	
Interação	51,98	<0,0001	****	Sim	
Tempo de estocagem	8,656	<0,0001	****	Sim	
Grupo de tomates	6,908	0,1151	ns	Não	
Tabela ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P valor
Interação	0,3005	12	0,02504	F (12, 120) = 10,99	P<0,0001
Tempo de estocagem	0,9192	3	0,3064	F (2,826, 113,1) = 134,5	P<0,0001
Grupo de tomates/revestimento	0,1531	4	0,03826	F (4, 40) = 12,53	P<0,0001
Resíduo	0,1222	40	0,003054	F (40, 120) = 1,340	P=0,1151
	0,2734	120	0,002279		

Apêndice S

Quadro S1: ANOVA bidirecional e comparações múltiplas de dados de SST da polpa de tomates revestidos independentes durante seu armazenamento

Fonte de variação	% da variação total	P valor	Resumo do valor P	Significativo?	
Interação	7,917	0,0399	*	Sim	
Tempo de estocagem	12,55	<0,0001	****	Sim	
Grupo de tomates	23,49	<0,0001	****	Sim	
Tabela ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interação	1,101	12	0,09174	F (12, 160) = 1,883	P=0,0399
Tempo de estocagem	1,746	3	0,5819	F (3, 160) = 11,95	P<0,0001
Grupo de tomates/revestimento	3,266	4	0,8164	F (4, 160) = 16,76	P<0,0001
Resíduo	7,793	160	0,04871		
Teste de comparações múltiplas de Dunnett	Diferenças de média	Intervalo de confiança de 95% da diferença	Significativo?	Resumo	Valor P ajustado
Grupo 5 vs. Grupo 1	0,2778	0,1495 to 0,4061	Sim	****	<0,0001
Grupo 5 vs. Grupo 2	-0,06111	-0,1894 to 0,06720	Não	ns	0,5870
Grupo 5 vs. Grupo 3	-0,09722	-0,2255 to 0,03109	Não	ns	0,1922
Grupo 5 vs. Grupo 4	0,1000	-0,02831 to 0,2283	Não	ns	0,1727

Apêndice T

Quadro T1: ANOVA bidirecional e comparações múltiplas de dados de acidez total da polpa de tomates revestidos independentes durante seu armazenamento

Fonte de variação	% da variação total	P valor	Resumo do valor P	Significativo?	
Interação	26,02	<0,0001	****	Sim	
Tempo de estocagem	14,53	<0,0001	****	Sim	
Grupo de tomates/revestimento	1,182	0,5197	ns	Não	
Tabela ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interação	0,3997	12	0,03331	F (12, 160) = 5,953	P<0,0001
Tempo de estocagem	0,2233	3	0,07442	F (3, 160) = 13,30	P<0,0001
Grupo de tomates/revestimento	0,01816	4	0,004540	F (4, 160) = 0,8112	P=0,5197
Resíduo	0,8953	160	0,005596		

Quadro U1: ANOVA bidirecional e comparações múltiplas de dados do índice de maturação de tomates revestidos independentes durante seu armazenamento

Fonte de variação	% da variação total	P valor	Resumo do valor P	Significativo?	
Interação	20,83	<0,0001	****	Sim	
Tempo de estocagem	16,96	<0,0001	****	Sim	
Grupo de tomates/revestimento	1,959	0,2721	ns	Não	
Tabela ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interação	80,62	12	6,718	F (12, 160) = 4,609	P<0,0001
Tempo de estocagem	65,65	3	21,88	F (3, 160) = 15,01	P<0,0001
Grupo de tomates/revestimento	7,584	4	1,896	F (4, 160) = 1,301	P=0,2721
Resíduo	233,2	160	1,458		
Teste de comparações múltiplas de Dunnett	Diferenças de média	Intervalo de confiança de 95% da diferença	Significativo?	Resumo	Valor P ajustado
Dia 0					
Grupo 5 vs. Grupo 1	-0,5970	-2,001 to 0,8069	Não	ns	0,6770
Grupo 5 vs. Grupo 2	-0,2684	-1,672 to 1,135	Não	ns	0,9713
Grupo 5 vs. Grupo 3	-0,5579	-1,962 to 0,8459	Não	ns	0,7248
Grupo 5 vs. Grupo 4	-0,9813	-2,385 to 0,4225	Não	ns	0,2529
Dia 3					

Grupo 5 vs. Grupo 1	1,191	-0,2130 to 2,595	Não	ns	0,1208
Grupo 5 vs. Grupo 2	1,558	0,1545 to 2,962	Sim	*	0,0243
Grupo 5 vs. Grupo 3	1,355	-0,04883 to 2,759	Não	ns	0,0619
Grupo 5 vs. Grupo 4	1,491	0,08706 to 2,895	Sim	*	0,0336
Dia 6					
Grupo 5 vs. Grupo 1	-1,492	-2,896 to -0,08817	Sim	*	0,0334
Grupo 5 vs. Grupo 2	-2,505	-3,909 to -1,101	Sim	****	<0,0001
Grupo 5 vs. Grupo 3	-1,916	-3,320 to -0,5120	Sim	**	0,0036
Grupo 5 vs. Grupo 4	-0,4172	-1,821 to 0,9866	Não	ns	0,8763
Dia 9					
Grupo 5 vs. Grupo 1	2,405	1,001 to 3,809	Sim	***	0,0002
Grupo 5 vs. Grupo 2	1,196	-0,2080 to 2,600	Não	ns	0,1185
Grupo 5 vs. Grupo 3	1,535	0,1316 to 2,939	Sim	*	0,0272
Grupo 5 vs. Grupo 4	1,897	0,4931 to 3,301	Sim	**	0,0040