

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



Cobertura para conservação de morangos: desenvolvimento, aplicação e caracterização de coberturas bioativas de alginato de sódio e de ágar-ágar adicionadas de óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e de laranja doce (*Citrus aurantium* var. *Dulcis*) com propriedades antimicrobianas.

Gabriela Venturini Antunes

Pelotas, maio de 2021

GABRIELA VENTURINI ANTUNES

Cobertura para conservação de morangos: desenvolvimento, aplicação e caracterização de coberturas bioativas de alginato de sódio e de ágar-ágar adicionadas de óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e de laranja doce (*Citrus aurantium* var. *Dulcis*) com propriedades antimicrobianas.

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

Orientador – Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra

Co-orientadores – Prof^a. Dr^a. Marcia Arocha Gularte

– Prof^a. Dr^a. Tatiane Kuka Valente Gandra

Pelotas, maio de 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A636c Antunes, Gabriela Venturini

Cobertura para conservação de morangos: desenvolvimento, aplicação e caracterização de coberturas bioativas de alginato de sódio e de ágar-ágar adicionadas de óleos essenciais de tomil / Gabriela Venturini Antunes ; Eliezer Avila Gandra, orientador ; Marcia Arocha Gularte, Tatiane Kuka Valente Gandra, coorientadoras. – Pelotas, 2021.

121 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Vida útil. 2. Coberturas comestíveis. 3. Propriedades antimicrobianas. 4. Nutrição. I. Gandra, Eliezer Avila, orient. II. Gularte, Marcia Arocha, coorient. III. Gandra, Tatiane Kuka Valente, coorient. IV. Título.

CDD : 641.1

Resumo

ANTUNES, Gabriela Venturini. **Coberturas para conservação de morangos: desenvolvimento, aplicação e caracterização de coberturas bioativas de alginato de sódio e de ágar-ágar adicionadas de óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e de laranja doce (*Citrus aurantium* var. *Dulcis*) com propriedades antimicrobianas.** Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

A mudança de hábitos alimentares vem ocorrendo no mundo todo, e a busca de uma vida mais saudável é um dos fatores que estimulam a comercialização de alimentos minimamente processados, como ocorre com o morango, no entanto, trata-se de uma fruta que possui uma vida útil após a colheita muito curta. Dentre os fatores responsáveis pela perda de sua qualidade estão a alta atividade metabólica e a elevada susceptibilidade ao ataque microbiano. Desta forma é importante que se identifique aspectos qualitativos, em especial aqueles voltados aos cuidados com a conservação e prevenção de contaminações por microrganismos. Uma tecnologia alternativa cada vez mais utilizada e avaliada como um procedimento viável para elevar o tempo de vida de frutas, é o emprego de coberturas comestíveis, juntamente com a adição de óleos essenciais a fim de preservar a vida útil destes frutos. O trabalho objetivou desenvolver, aplicar e caracterizar o efeito da utilização de coberturas comestíveis bioativas, a base de ágar-ágar ou de alginato de sódio adicionadas de óleos essenciais de tomilho e/ou de laranja doce, com propriedades antimicrobianas especialmente anti-*Listeria monocytogenes* sobre o morango. Verificou-se o efeito das coberturas nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais determinantes da vida útil de morangos nos tempos de 1, 8 e 15 dias após elaboração do produto. Foi avaliado ainda, o efeito frente à bactéria *Listeria monocytogenes* em morangos artificialmente contaminados com este microrganismo. Foi possível determinar que a cobertura de alginato, adicionadas de óleo essencial de laranja doce e de tomilho apresentou os melhores resultados, tanto do ponto de vista físico-químico, quanto antimicrobiano nas amostras analisadas. Quanto à *Listeria Monocytogenes*, a cobertura aplicada após a contaminação do fruto mostrou efeito antimicrobiano. A análise sensorial com método Teste de Associações Implícitas, teve associação das respostas “sim” ou “não” com o tempo em segundos, relacionado a cada cobertura apresentada.

Palavras-chave: vida útil, coberturas comestíveis, propriedades antimicrobianas.

Abstract

ANTUNES, Gabriela Venturini. **Development of bioactive toppings of sodium alginate and agar-agar for strawberries added with essential oils of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and sweet orange (*Citrus aurantium* var. *Dulcis*) with antimicrobial properties.** 2021. 117f. Dissertation (Master in Nutrition and Food) - Graduate Program in Nutrition and Food, Faculty of Nutrition, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

The change in eating habits has been taking place all over the world, and the search for a healthier life is one of the factors that encourage the sale of minimally processed foods, such as strawberries, however, it is a fruit that has a Shelf life after harvest is very short. Among the factors responsible for the loss of its quality are the high metabolic activity and the high susceptibility to microbial attack. Thus, it is important to identify qualitative aspects, especially those focused on the care of conservation and prevention of contamination by microorganisms. An alternative technology increasingly used and evaluated as a viable procedure to increase the shelf life of fruits is the use of edible coatings, together with the addition of essential oils in order to preserve the shelf life of these fruits. The work aimed to develop, apply and characterize the effect of using bioactive edible coatings, based on agar-agar or sodium alginate, added with essential oils of thyme and/or sweet orange, with antimicrobial properties, especially anti-*Listeria monocytogenes* on The strawberry. The effect of the coatings on the physicochemical, microbiological and sensory characteristics that determine the shelf life of strawberries was verified in the times of 1, 8 and 15 days after the product was elaborated. The effect against *Listeria monocytogenes* bacteria in strawberries artificially contaminated with this microorganism was also evaluated. It was possible to determine that the alginate coating, added with sweet orange and thyme essential oil, presented the best results, both from a physicochemical and antimicrobial point of view in the analyzed samples. As for *Listeria Monocytogenes*, the coating applied after the contamination of the fruit showed an antimicrobial effect. Sensory analysis using the Implicit Association Test method had an association of "yes" or "no" responses with time in seconds, related to each coverage presented.

Keywords: shelf life, edible coatings, antimicrobial properties.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Delineamento experimental.....	63
Quadro 2 Tratamentos aplicados.....	65
Quadro 3 Tratamentos aplicados.....	69
Quadro 4 Cronograma.....	72
Quadro 5 Orçamento do projeto.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Tratamentos aplicados a morangos com e sem coberturas comestíveis de ágar-ágar ou alginato de sódio, adicionadas de óleo essencial de tomilho e/ou laranja doce	73
Tabela 2 Tratamentos aplicados a morangos com e sem coberturas comestíveis de alginato de sódio, adicionadas de óleo essencial de tomilho e/ou laranja doce para avaliação do efeito anti- <i>Listeria monocytogenes</i>	76
Tabela 3 Análises físico-químicas realizadas em morangos com e sem cobertura de alginato de sódio, adicionada ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C.....	79
Tabela 4 Análises físico-químicas realizadas em morangos com e sem cobertura de ágar-ágar, adicionada ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C.....	80
Tabela 5 Análises microbiológicas realizadas em morangos com e sem cobertura de alginato de sódio, adicionada ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C.....	86
Tabela 6 Análises microbiológicas realizadas em morangos com e sem cobertura de ágar-ágar, adicionada ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C.....	87
Tabela 7 <i>Listeria monocytogenes</i> em morangos com e sem cobertura de alginato adicionada de ambos os óleos essenciais, ou seja, de laranja doce e de tomilho, em triplicata sob temperatura de 7°C.....	93
Tabela 8 Resultados de “não e sim” e tempo de resposta no Teste de Associações Implícitas (TAI) em morangos com cobertura de alginato e de ágar-ágar (n=45)	95

SUMÁRIO

1	Introdução	9
2	Objetivos	11
2.1	Objetivo geral	11
2.2	Objetivos Específicos	11
3	Hipótese	12
4	Revisão de literatura	14
4.1	O morango	14
4.2	Doenças transmitidas por alimentos e microrganismos	18
4.3	Microrganismos indicadores da qualidade microbiológica dos alimentos	19
4.3.1	Bactérias Anaeróbias	19
4.3.2	Coliformes	19
4.3.3	Microrganismos Psicotróficos	20
4.3.4	<i>Listeria monocytogenes</i>	20
4.3.4.1	Características de <i>L. monocytogenes</i>	22
4.3.4.2	Regulamentações para <i>L. monocytogenes</i> em alimentos	23
4.4	Óleos essenciais e sua ação antimicrobiana	23
4.5	Coberturas comestíveis	26
4.5.1	Alginato	27
4.5.2	Ágar-ágar	28
5	Projeto de pesquisa	31
6	Relatório de campo	71
7	Artigo	72
8	Considerações finais	106
9	Referências bibliográficas	108

1.Introdução

Com as mudanças de hábitos e estilo de vida das pessoas no mundo todo, buscando uma alimentação mais saudável, a sociedade moderna vem incrementando o mercado de alimentos. O nicho de frutas prontas para consumo ou que exigem pouco ou nenhum preparo para serem consumidas com segurança, tem sido cada vez mais explorado, em especial pela conveniência e praticidade que estes produtos oferecem, tanto na hora de comprar quanto na hora de consumir (ALVES *et al*, 2011,; ANTUNES *et al*, 2012).

Por outro lado, nas últimas décadas, o aumento de toxinfecções por alimentos tem preocupado as organizações responsáveis pela saúde pública mundial. A epidemiologia de doenças causadas por microrganismos presentes em alimentos tem mudado, em função de fatores como aumento da suscetibilidade da população, mudanças no comportamento alimentar e aparecimento de patógenos emergentes, que estão envolvidos na produção, processamento e distribuição de alimentos (GOMEZ-ALDAPA *et al*, 2017).

O morango é uma fruta muito tradicional que pode ser consumida *in natura* ou em diversas preparações, tais como caldas, iogurtes, bebidas, biscoitos e sorvetes, entre outras. Além de ter uma produção sazonal, é uma fruta muito delicada com alta taxa respiratória, sendo, por isso, altamente perecível (CASTRICINI *et al*, 2017). A comercialização de morangos a grandes distâncias é dificultada devido à sua elevada perecibilidade, decorrente principalmente da sua suscetibilidade ao desenvolvimento de agentes microbianos, inclusive patogênicos (CUNHA JUNIOR *et al*, 2012).

Uma preocupação quanto a qualidade do morango, diz respeito a presença de *Listeria spp*, comumente associada com matéria vegetal e solo e que pode ser mais comum em frutas e vegetal cultivados em estreita associação com o solo (SIQUEIRA, 2013). A *Listeria spp.*, é um gênero bacteriano que inclui espécies patogênicas encontradas amplamente distribuídas na natureza, já tendo sido isoladas de uma grande variedade de locais, principalmente pelos alimentos. Dentre suas espécies *Listeria monocytogenes* é considerada a espécie patogênica para o homem, causa a listeriose, que é uma infecção alimentar severa, com alta taxa de mortalidade em imunodeprimidos.

Conhecendo-se a ampla distribuição de *L. monocytogenes* na natureza, sua patogenicidade, capacidade de sobreviver mesmo em alimentos refrigerados e a sua importância em relação à saúde pública, torna-se necessário a elaboração de medidas eficazes relacionadas à pesquisa deste patógeno em alimentos e no controle da contaminação (SIQUEIRA, 2013).

A utilização de óleos essenciais com a finalidade de minimizar contaminantes microbiológicos, inclusive patógenos, em alimentos tem sido uma importante alternativa, considerando a sua forte ação antimicrobiana e a sua baixíssima toxicidade. Estes compostos atuam na membrana plasmática, levando ao vazamento de substratos citoplasmáticos, resultando em morte celular, podendo ser um importante aliado na conservação de frutas (MIYAGUE *et al*, 2013).

Uma tecnologia alternativa cada vez mais utilizada e avaliada como um procedimento viável para elevar o tempo de vida de frutas, é o emprego de coberturas comestíveis. Estes revestimentos têm por objetivo apresentar uma atuação funcional e coadjuvante, contribuindo para a preservação da textura e do valor nutricional, reduzindo as trocas gasosas superficiais, os processos oxidativos e a perda ou ganho excessivo de água. Ao promover alterações na permeação e, por conseguinte, alterar a atmosfera interna, essas coberturas têm sido indicadas, principalmente, para produtos com alta taxa respiratória (ASSIS; BRITTO, 2014).

A limitação sensorial da aplicação direta de óleos essenciais em alimentos é um fator que contribui para um menor número de estudos envolvendo esta prática, tendo em vista a acentuada modificação que causam no sabor e no aroma do produto. Diante disso, uma opção para a utilização direta seria a inclusão de óleos essenciais em filmes ou coberturas comestíveis bioativas, que permitissem a ação do óleo sem alterar significativamente as características sensoriais do produto (DANNENBERG *et al.*, 2017).

Com o propósito de testar a potencialidade de coberturas bioativas à base de ágar-ágar e alginato, incorporadas com óleo essencial de tomilho e óleo essencial de laranja doce, idealizou-se aplicá-las em morangos de forma a manter as características físico-químicas, inibir o desenvolvimento fúngico e bacteriano e avaliar o potencial antimicrobiano frente à *Listeria monocytogenes*.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Desenvolver, aplicar e caracterizar o efeito da utilização de coberturas comestíveis bioativas a base de ágar-ágar ou de alginato de sódio adicionadas de óleos essenciais de tomilho e/ou de laranja, com propriedades antimicrobianas especialmente anti-*Listeria monocytogenes* sobre o morango.

2.2 Objetivos específicos

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

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

Aplicar as coberturas bioativas a base de ágar-ágar ou de alginato de sódio adicionadas de óleos essenciais de tomilho e/ou de laranja doce em morangos e avaliar as características físico-químicas e microbiológicas;

Aplicar as coberturas bioativas adicionadas de óleos essenciais de tomilho e/ou de laranja doce em morangos e avaliar a atividade antibacteriana frente à *Listeria monocytogenes*;

Caracterizar o efeito da utilização das coberturas comestíveis bioativas no tocante aos aspectos físico-químicos, microbiológicos e sensoriais determinantes da vida útil de morangos.

3 Hipóteses

Coberturas bioativas de ágar-ágar ou de alginato de sódio com adição de óleo essencial de tomilho e/ou de laranja doce mantêm as características físico-químicas e inibem o desenvolvimento de bactérias e fungos em morangos.

Morangos com coberturas bioativas incorporados com óleo essencial de tomilho e/ou óleo essencial de laranja doce, apresentam efeito antimicrobiano frente à *Listeria monocytogenes*.

Morangos com coberturas bioativas de ágar-ágar ou alginato de sódio incorporados com óleo essencial de tomilho e/ou de laranja doce, apresentam aceitação para o consumo.

4 Revisão de Literatura

Frutas prontas para consumo ou que exigem pouco ou nenhum preparo para serem consumidas com segurança, estão sendo cada vez mais demandadas, principalmente pela conveniência e praticidade que estes produtos oferecem, tanto na hora de comprar quanto na hora de consumir (ANTUNES *et al*, 2012; ALVES *et al*, 2011).

As frutas desempenham um papel muito importante em nossa alimentação. São fontes naturais de vitaminas e sais minerais, além de fornecerem fibras e outros nutrientes que contribuem para a prevenção de doenças.

Entre as frutas de preferência do consumidor está o morango, não apenas pelo seu sabor, mas também em razão do seu valor nutricional.

4.1 O morango

O morango é cultivado em diversos países e, no Brasil, alcança uma produção de 8.926 kg/ha (FAO Stat, 2018) concentrando a sua maior produção em estados abrangidos por regiões de clima temperado e subtropical, que oferecem as melhores condições para seu desenvolvimento, como de Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina (OLIVEIRA; SCIVITTARO, 2009).

O morangueiro é uma planta pertencente à família das Rosáceas, que possui espécies frutíferas de interesse econômico. É das regiões de clima temperado da Europa e das Américas. A espécie de morangueiro produzida comercialmente nos dias de hoje é um híbrido natural, resultante de um cruzamento casual entre duas espécies americanas levadas à França (ANTUNES *et al*, 2011). É uma planta herbácea perene, com caules curtos (coroas) e folhas densamente espaçadas. O morango produz frutas acessórias e agregadas complexas compostas por aquênios e um receptáculo. Os aquênios são pequenos frutos secos, de semente única, enquanto o receptáculo é considerado anatomicamente equivalente ao tecido do meristema floral (HOLLENDER *et al.*, 2012).

Assim como a framboesa, mirtilo e *gojiberry*, o morango pertence ao grupo das frutas vermelhas, também conhecido por *berries*. Esse grupo se caracteriza por frutas ricas em vitaminas (A, C, E e do complexo B), minerais, compostos fenólicos (ácido elágico e gálico) e flavonóides (catequinas, quercetinas e antocianinas), sendo atribuídas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes nessas frutas (CARDOZO; MAFRA, 2015). Os morangos são benéficos para a dieta humana como fonte de macro e micronutrientes, vitaminas e antioxidantes promotores de saúde (GIAMPIERI *et al.*, 2015).

É classificado como fruto não-climatérico e possui alta taxa respiratória, sendo assim, é muito perecível e tem curto tempo de vida pós-colheita. O ponto de maturação do fruto durante a colheita é de essencial importância, pois influencia diretamente na palatabilidade e aparência do fruto e, conseqüentemente, na aceitação pelo consumidor (GONÇALVES *et al.*, 2012).

De acordo com Chitarra e Chitarra (1990) o morango alcança, após sua colheita, uma vida de até 10 dias se atendidas suas necessidades de temperaturas entre 0-5 °C, com 10% de oxigênio e 15-20% de CO₂.

Em decorrência do grau de exigência desses frutos durante seu armazenamento e a dificuldade de certos comércios manterem este controle, a intensa atividade metabólica do morango, associada à sua suscetibilidade frente à ação de microrganismos, apresenta uma vida de prateleira relativamente mais curta do que o esperado.

O morango é afetado por vários patógenos, incluindo fungos, bactérias, vírus e nematóides. Os patógenos economicamente mais impactantes do morango são os fungos, principalmente *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium digitatum* e *Botrytis cinerea*, que podem infectar todas as partes da planta e causar danos graves ou a morte do fruto (GALINDO *et al.*, 2011).

O morango é muito conhecido pelo seu sabor doce e propriedades sensoriais, e tem sido observado seus efeitos no tratamento de doenças crônicas como câncer e doenças cardíacas, além de ser uma fonte importante de algumas vitaminas como a vitamina C, vitamina A e folatos. A cor é provavelmente o atributo de aparência mais importante no morango, sendo causado pelo acúmulo de antocianinas. Açúcares são implicados no sabor da fruta e determina o valor calórico dos morangos. Ácidos orgânicos estão envolvidos no sabor, textura, pH

e cor dos morangos, alterando a qualidade desta fruta (DIEL *et al*, 2018; ORNELAS-PAZ, 2015; GIAMPIERI *et al*, 2012).

Nutricionalmente o morango apresenta características relevantes à saúde do consumidor, por possuir elevado percentual de fibras, tem potencial para reduzir a glicemia sanguínea e possui efeito de saciedade. Em menor grau são fontes de ácidos graxos essenciais, já que o óleo de semente de morango é rico em ácidos graxos insaturados. Por possuir grandes quantidades de vitamina C, o morango é uma fonte importante para nutrição humana. É considerado também um alimento fonte de folato e apresenta cerca de 20 a 25g/100g de manganês, fornecendo mais de 20% da ingestão diária adequada, além de ser uma fonte de várias outras vitaminas, como a tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6, vitamina K, vitamina A e vitamina E (GIAMPIERI *et al*, 2012).

Durante o período de amadurecimento do morango ocorrem diversas transformações, o processo de maturação do morango resulta em uma série de alterações no fruto, caracterizadas por alterações fisiológicas e bioquímicas como mudança de cor, melhoria da aparência, redução da firmeza de polpa, perda de massa, aumento dos teores de sólidos solúveis totais e diminuição do teor de acidez total titulável. Tais indicadores servem como parâmetro de qualidade dos frutos (PRATES; ASCHERI, 2011).

A perda ou redução da firmeza é, conforme Aday *et al.* (2013), resultado da ação enzimática sobre componentes da parede celular. A perda de água dos tecidos do fruto em razão da evaporação pela transpiração do fruto pode levar à perda de massa, alterações na firmeza e na aparência (VELICKOVA *et al.*, 2013). A taxa limite para perda de massa do morango varia de 6 % a 10 % (NUNES *et al.*, 1995). A perda de massa de morangos pode ser minimizada com o uso de baixas temperaturas e umidade relativa do ambiente maior que 90% (VICENTE *et al.*, 2002).

O morango apresenta uma taxa respiratória de aproximadamente de 6mg a 10mg de CO₂/kg.h a 0°C, a qual aumenta de quatro a cinco vezes quando a temperatura sobe para 10°C, e até dez vezes se a temperatura alcança 20°C (MITCHAM *et al.*, 2003). Em decorrência dessa alta perecibilidade, a comercialização e a disponibilidade de morangos são restritas.

A rápida deterioração dos frutos e as doenças pós-colheita acarretam perdas consideráveis, qualitativas e econômicas. A contaminação microbiológica, injúrias mecânicas, desidratação e perda de turgor estão entre os principais fatores limitantes da vida útil dos morangos. Dessa forma, tecnologias estão sendo estudadas com o objetivo de prolongar a sua vida útil. Como os frutos de morango são consumidos preferencialmente *in natura* torna-se interessante a utilização de material biodegradável e comestível para aumentar seu período de comercialização, sem que seja alterado o sabor, a cor e o aroma dos frutos (PRATES; ASCHERI, 2011; GARCIA, 2006)

De acordo com Shigematsu (2017), o processamento mínimo, em razão do manuseio e do aumento de injúrias mecânicas, resulta na perda da integridade celular e conseqüente dano à compartimentalização de enzimas e substratos. Sendo assim, contribui para reações de escurecimento e formação de metabólitos secundários envolvidos na produção de odores desagradáveis favorecendo também a contaminação de frutas por microrganismos, inclusive patogênicos, que por sua vez aceleram a degradação e a perda de qualidade e reduzem o tempo de vida útil dos produtos.

Outro problema observado na fruta é a deterioração pós-colheita, a qual é normalmente retardada pelo armazenamento em baixas temperaturas, em atmosferas controladas ou pela utilização de tratamentos que reduzem o metabolismo do produto (GARCIA, 2006).

As embalagens utilizadas para comercialização são recipientes de polietileno tereftalato (PET), geralmente transparentes, ou então bandejas de poliestireno expandido (isopor), cobertas com filme de polivinil cloreto (PVC) maleável ou com tampas perfuradas. Normalmente a capacidade é de 250 a 500mg de morangos, distribuídas em uma ou duas camadas. Durante o armazenamento recomenda-se manter a temperatura da câmara fria de 0 a 1°C e a umidade relativa entre 90-95% (EMBRAPA, 2005).

No entanto, não só sob o aspecto da conservação e tempo de prateleira do morango cabe atenção, mas em especial pela importância de se evitar a sua contaminação por agentes patogênicos capazes de produzir doenças nos consumidores.

4.2 Doenças transmitidas por alimentos e os microrganismos

De acordo com a Portaria nº. 20 de 2017 da Secretaria da Saúde do estado do Rio Grande do Sul, na categoria de alimentos minimamente processados (MP) são incluídos os vegetais, ou seja, frutas, legumes, hortaliças, ou suas combinações, que tenham passado por algum tipo de processamento como seleção, corte, fatiamento, lavagem, desinfecção, enxágue, centrifugação, embalagem e armazenamento (RIO GRANDE DO SUL, ANEXO I, 2017). Também se incluem outros alimentos que permitam a manutenção de estado fresco, devida qualidade sensorial e que apresente segurança para o consumo.

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorrem pela ingestão de alimentos sólidos ou líquidos contaminados com microrganismos patogênicos que afetam a saúde do consumidor em forma individual ou coletiva. Um aumento nos surtos de doenças transmitidas por alimentos nos últimos anos tem sido associado ao maior consumo de frutas e vegetais frescos. A contaminação bacteriana pode ocorrer em qualquer uma das etapas de processamento, tais como colheita, corte, lavagem, imersão, desidratação, mistura e/ou embalagem destes alimentos (GOMEZ-ALDAPA *et al*, 2017; SIQUEIRA, 2013;).

A demanda por frutas e hortaliças com processamento mínimo vem crescendo em especial pelo interesse de consumidores em busca de alimentos saudáveis associados à praticidade e conveniência. Para redução da contaminação dos alimentos e das notificações de surto de origem alimentar, as boas práticas de manipulação surgem como importante ferramenta de prevenção e como conceito genérico, consiste em procedimentos que devem ser adotados por serviços de alimentação a fim de garantir a qualidade higiênico-sanitária e a conformidade dos alimentos com objetivo de produzir alimentos seguros ao consumidor (SIQUEIRA, 2013).

4.3 Microrganismos indicadores da qualidade microbiológica dos alimentos

Há grupos de microrganismos que, por meio de sua avaliação, pode-se identificar as condições sanitárias, higiene do processamento e armazenamento dos alimentos, bem como a presença de microrganismos patogênicos, entre

outras características. Franco e Landgraf (2005) definem microrganismos indicadores como sendo grupos ou espécies de microrganismos cuja presença no alimento pode informar a respeito da ocorrência de contaminação fecal, presença de patógeno, potencial deterioração, ou ainda, indicar más condições sanitárias em alguma das etapas percorridas pelo alimento até chegar ao consumidor (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

4.3.1 Bactérias anaeróbias

A presença desses microrganismos indica a ocorrência no alimento de condições favoráveis à multiplicação de patógenos anaeróbios, como o *Clostridium perfringens* ou o *Clostridium botulinum* (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

4.3.2 Coliformes

São bacilos Gram-negativos e não formam esporos. Esse grupo é constituído de bactérias da família *Enterobacteriaceae* que ao sofrerem incubação entre 35 e 37°C por 48h, são capazes de fermentar lactose produzindo gás (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Os coliformes termotolerantes pertencem aos coliformes totais como um subgrupo desses, específico de bactérias fermentadoras de lactose a temperatura de 44,5 a 45,5°C, com produção de gás. A ocorrência de coliformes termotolerantes em alimentos não configura exatamente uma contaminação de origem fecal, mas pode indicar importantes problemas de higiene durante ou após o processo de fabricação de determinados alimentos.

Em alimentos de origem vegetal, em estado fresco, segundo Franco e Landgraf (2005), o único indicador considerado válido de contaminação fecal é a *E. coli*, tendo em vista a ocorrência natural dos outros indicadores de contaminação fecal nessas espécies de alimentos.

4.3.3 Microrganismos psicrotróficos

Os microrganismos psicrotróficos são aqueles que possuem, em geral, uma temperatura de crescimento entre 20 e 30 °C, mas com capacidade de adaptar ao frio através da alteração de seu metabolismo podendo apresentar crescimento em temperaturas de 0° e 7°C, com variação dessa velocidade dependendo do microrganismo, produzindo colônias ou turvação do meio de cultura num período de sete a 10 dias (FRANCO; LANDGRAF, 2005), podendo apresentar crescimento em temperaturas mais elevada, como o caso da *Listeria monocytogenes*.

4.3.4 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes foi reconhecida como agente patogênico da listeriose, após os surtos na década de 80 na América do Norte e Europa, com consequências sérias, invasivas e com risco de morte. Além do alto prejuízo econômico tanto para os órgãos públicos quanto para as indústrias, que passaram a demandar maior atenção para o patógeno, ao mesmo tempo se reconheceu o envolvimento e a importância dos alimentos na cadeia de transmissão da listeriose ao homem (SIQUEIRA, 2013).

O gênero *Listeria* está relacionado filogeneticamente aos gêneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Brochotrix*. Atualmente é composto por dez espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, e *L. weihenstephanensis* (ZHANG et al., 2007; HALTER, NEUHAUS; SCHERER, 2013). Apenas duas espécies são reconhecidamente patogênicas, *L. monocytogenes* que pode infectar uma variedade de espécies animais, incluindo o homem e *L. ivanovii* que apresenta patogenicidade restrita aos ruminantes (JEYALETCHUMI, 2010).

Listeria monocytogenes é o agente causador da listeriose, uma doença geralmente ligada ao consumo de alimentos contaminados. Historicamente, os alimentos associados a casos de listeriose foram carnes frias e queijos moles, no entanto, uma mudança recente foi observada com um número crescente de surtos ligados a produtos frescos (CDC 2021).

Esta enfermidade nos seres humanos apresenta sintomas que incluem septicemia, meningite, encefalite, infecção cervical ou intrauterina em gestantes, as quais podem provocar aborto ou nascimento prematuro. Gastrenterite com náuseas e vômitos pode proceder ou acompanhar as manifestações nas formas mais graves da doença. Ocorrem principalmente em pessoas pertencentes a grupos de risco, tais como gestantes, idosos, crianças e indivíduos imunossuprimidos devido ao uso de medicamentos como corticosteroides, drogas para câncer, e transplantados. O período de incubação é longo, podendo variar de 3 a 90 dias, o que dificulta a identificação do patógeno e o rastreamento para identificação do alimento contaminado que tenha causado a doença (SIQUEIRA, 2013).

O diagnóstico pode ser feito pela identificação dos sinais clínicos e sintomas, do isolamento bacteriano de material clínico como sangue, líquido cefalorraquidiano, líquido amniótico, fígado, baço, placenta e feto. A identificação também pode ser feita por imuno-histoquímica e achados histopatológicos (SIQUEIRA, 2013).

A patogênese da listeriose consiste na internalização da bactéria por fagocitose por células não fagocíticas de diferentes tecidos e órgãos. A estratégia de invasão, célula a célula, permite a sua disseminação no interior dos tecidos hospedeiros e a formação de focos infecciosos ficando assim protegidos das defesas do hospedeiro, como os anticorpos circulantes. Cada etapa do parasitismo intracelular por *L. monocytogenes* dependerá da produção de fatores de virulência, exercidos por diversas proteínas que estão envolvidas nas fases do ciclo intracelular. Em relação às outras doenças de origem alimentar a listeriose apresenta uma baixa incidência, mas com índices de mortalidade superiores a 30% em população de risco. Apesar das outras formas de transmissão, os alimentos têm sido claramente identificados como a mais importante fonte de infecção (ROWLANDS, 2013).

A dificuldade de eliminar este microrganismo das indústrias é potencializada pelas condições de umidade, temperatura e presença de matéria orgânica nas plantas, que aliadas à habilidade do patógeno em formar biofilmes podem desencadear a colonização de superfícies e equipamentos (SIQUEIRA, 2013).

A alta ocorrência do patógeno em diversos alimentos associada aos altos índices de mortalidade tornam *L. monocytogenes* um importante e complexo problema de saúde pública que tem provocado perdas para a indústria de alimentos devido aos inúmeros recolhimentos, voluntários e obrigatórios, realizados principalmente nos Estados Unidos e Canadá. De acordo com dados disponibilizados por CDC (2016), estima-se que este patógeno causa aproximadamente 1.600 hospitalizações por ano nos Estados Unidos.

4.3.4.1 Características de *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, com diâmetro de 0,4 a 0,5µm e comprimento de 0,51 a 2,0µm, aeróbica, intracelular e anaeróbica facultativa, não formadora de esporos, apresenta mobilidade característica em forma de “guarda-chuva” quando incubado em meio de cultura próprio entre 20 a 25°C. As colônias formadas são acinzentadas brilhantes sob iluminação normal e de coloração azul esverdeada quando observadas sob iluminação oblíqua (JEYALETCHUMI *et al*, 2010).

Em relação a suas características bioquímicas, é catalase positiva, oxidase negativa, móvel a 20°C, fermenta a glicose produzindo, principalmente, ácido láctico, apresenta teste positivo para vermelho de metila e Voges-Proskauer. Não utiliza citrato, não produz indol e hidrolisa piruvato de sódio e esculina. Também não hidrolisa uréia, gelatina e caseína (SIQUEIRA, 2013).

As necessidades nutricionais são comuns as das bactérias Gram-positivas. O pH para a multiplicação está na faixa de 6 a 8 podendo crescer também em 4,1 e 9,6. Apresenta crescimento na faixa de 3°C e 45°C classificando a como psicotróficas, podendo suportar repetidos congelamentos e descongelamentos. Os meios de cultura ideais para seu crescimento são *Brain Heart Infusion* (BHI) e Ágar Trypticase de Soja (TSA) (SIQUEIRA, 2013, FERREIRA, 2014).

A atividade de água ótima para o crescimento é próxima a 0,97, porém este agente tem a capacidade de se multiplicar em valores próximos a 0,92, que é considerado um valor muito baixo para desenvolvimento de patógenos vinculados por alimentos (SIQUEIRA, 2013).

L. monocytogenes tem habilidade de produzir biofilme e sobreviver por vários meses em ambientes processadores de alimentos. A estrutura do biofilme protege o microrganismo de fatores físicos e químicos (MIYAGUE *et al*, 2013).

4.3.4.2 Regulamentações para *Listeria monocytogenes* em alimentos

Alguns países estabeleceram limites legais para o nível de contaminação de microrganismos permitidos em alimentos, especialmente para os produtos prontos para consumo, enquanto outros países têm sugerido procedimentos ou critérios que não tem amparo legal (JAY, 2005).

Os EUA adotaram a política de “tolerância zero”, de modo que a presença de *L. monocytogenes* em 25g de qualquer tipo de alimento pronto para o consumo é considerado inaceitável, caracterizando o impróprio para o consumo humano (MARTINS, 2009).

No Brasil, os padrões microbiológicos para alimentos, estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pela IN nº60 de 2019 definiu a ausência de *L. monocytogene* sem 25g somente para alguns queijos. Para os demais alimentos não são contemplados limites específicos para esta bactéria (BRASIL, 2019).

4.4 Óleos essenciais e sua ação antimicrobiana

Óleos essenciais são compostos naturais isolados de plantas aromáticas, e têm sido usados para uma ampla variedade de propósitos como remédios usados na saúde humana como alimentos funcionais, como aditivos alimentares, suplementos nutricionais e fabricação de cosméticos. Os óleos essenciais têm baixa toxicidade em mamíferos e degradam-se rapidamente na água e no solo, tornando-os favoráveis ao meio ambiente. São extraídos de diversas plantas em diferentes lugares (flor, semente, raiz) por diversas técnicas, como por exemplo, extração por solventes, destilação a vapor, sendo este último o mais utilizado em escala de produção comercial, por apresentar 93% de extração, sendo mais barato quando comparado com métodos mais avançados (GALINDO, 2017; KAVANAUGH, 2012).

Alguns óleos essenciais possuem naturalmente a função de antioxidantes e são eficazes para inibir diferentes doenças humanas devido às suas propriedades antirradicais e antimicrobianas. Portanto, a investigação de compostos bioativos particularmente polifenóis de fontes vegetais naturais, incluindo ervas e especiarias, têm uma tendência crescente. Os óleos essenciais de plantas têm potenciais efeitos benéficos em certas condições de saúde. Estes, geralmente reconhecidos como substâncias de natureza segura, inibem a oxidação lipídica em alimentos, podendo servir como aditivos naturais em alimentos e produtos alimentícios (ZENGIN, 2014; KAVANAUGH, 2012; ANTUNES *et al*, 2012).

Estes compostos atuam na membrana plasmática de microrganismos, levando ao vazamento de substratos citoplasmáticos, resultando em morte celular. No entanto, a maioria destes compostos altera significativamente os aspectos sensoriais dos produtos alimentícios quando adicionados em doses antimicrobianas eficientes (MIYAGUE *et al*, 2013).

Os óleos essenciais são uma mistura de compostos voláteis e consistem principalmente de hidrocarbonetos monoterpenos. Óleos cítricos são uma mistura de mais de três compostos: hidrocarbonetos terpênicos, compostos oxigenados e compostos não voláteis. A fração terpeno pode ser de 50 a mais de 95% do óleo; no entanto, tem pouca contribuição para o sabor e fragrância do óleo (ALI *et al*, 2012).

Alguns cientistas relataram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de orégano, tomilho, sálvia, alecrim, cravo, coentro, alho e cebola contra bactérias e fungos. A composição, estrutura, bem como grupos funcionais dos óleos desempenham um papel importante na determinação de sua atividade antimicrobiana. Estes efeitos variam para a conservação de culturas alimentares armazenadas, em particular, a atividade antimicrobiana de óleos formou a base de muitas aplicações, incluindo a preservação de alimentos crus e processados, a fim de prolongar a vida de prateleira destes alimentos (TONGNUANCHAN E BENJAKUL, 2014).

O óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) possui uma substância chamada carvacrol, sendo o principal componente (45%) destes óleos, é capaz de desintegrar a membrana externa de bactérias Gram-negativas, liberando

lipopolissacarídeos e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática ao ATP. Para bactérias gram-positivas, é capaz de interagir com membranas e alterar a permeabilidade de cátions como H⁺ e K⁺. A remoção do substituinte do anel alifático do carvacrol diminui ligeiramente a atividade antimicrobiana (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

O óleo essencial de laranja doce (*Citrus aurantium* var. *Dulcis*) se encontra em grandes quantidades no flavedo da fruta. A casca das frutas cítricas compreende duas camadas, camada externa vermelha como flavedo e camada branca interna como albedo. O flavedo é muito fino e frágil contendo vesículas olíferas no interior que podem ser recolhidos por raspagem, sendo sua camada interna geralmente incolor e esponjosa de mesofilo que muda de caráter e espessura ao longo do desenvolvimento da fruta, propriedade que pode determinar a facilidade de *peeling*. O albedo, deitado sob o flavedo consiste em células semelhantes a tubulações unidas para formar a massa de tecido comprimida na área intercelular. O albedo é rico em flavonóides, que, se transferidos para o suco, confere gosto amargo (ETEBU; NWAUZOMA, 2014).

Utilizado também como componente ativo para aplicação em embalagens de alimentos, os óleos essenciais aumentam significativamente a barreira de vapor de água, devido a sua característica hidrofóbica. A utilização de óleos essenciais em alimentos deve ser cautelosa, pelo fato de que o excesso de compostos aromáticos no alimento acarretará características sensoriais indesejáveis (GALINDO, 2017).

Há a necessidade de minimizar os riscos de contaminação de alimentos, no entanto, os consumidores estão exigindo produtos levemente processados que mantenham seu sabor e vida útil prolongada. Assim, o uso de conservantes naturais, como os óleos essenciais, que poderiam evitar o crescimento microbiano em alimentos é uma tendência atual (MIYAGUE *et al*, 2013).

4.5 Coberturas comestíveis

As coberturas comestíveis estão sendo amplamente testadas em função de poderem, potencialmente, aumentar a vida útil das frutas. Podem ser definidas como uma fina camada, aplicada sobre o produto, que, em função de

sua permeabilidade aos gases, vapor de água e solutos, reduz o metabolismo do produto, podendo assim, prolongar sua vida útil e sua ação antimicrobiana (GARCIA, 2006; PARREIDT *et al*, 2018; ANTUNES *et al*, 2012).

Como objetivo as coberturas comestíveis podem apresentar uma atuação funcional e coadjuvante, contribuindo para a preservação da textura e do valor nutricional, reduzindo as trocas gasosas superficiais e a perda ou ganho excessivo de água. Ao promover alterações na permeação e, por conseguinte, modificar a atmosfera interna, essas coberturas têm sido indicadas, principalmente, para produtos com alta taxa de respiração. São aplicadas ou formadas diretamente sobre a superfície das frutas, configurando membranas delgadas, imperceptíveis a olho nu e com diversas características estruturais, que são dependentes da formulação da solução filmogênica precursora. Como estas coberturas passam a fazer parte do alimento a serem consumidos, os materiais empregados em sua formação devem ser considerados como atóxicos e seguros para o uso em alimentos. (ASSIS; BRITTO, 2014).

As coberturas podem atuar como veículos para uma ampla quantidade de aditivos alimentares, incluindo agentes anti-escurecimento, corantes, aromatizantes, nutrientes, especiarias e diversos compostos antimicrobianos que estenderiam a vida de prateleira desses produtos e reduziriam o risco de crescimento de patógenos na superfície dos alimentos. As substâncias mais utilizadas na elaboração de filmes e coberturas comestíveis são as proteínas (gelatina, caseína, ovo albumina, glúten de trigo e proteínas miofibrilares) e os polissacarídeos (amido e seus derivados, pectina, celulose e seus derivados, alginato) e os lipídios (monoglicerídeos acetilados, ácido esteárico, ceras e ésteres de ácido graxo) ou a combinação dos mesmos (SHIGEMATSU, 2017).

Os revestimentos à base de polissacarídeos são considerados um dos materiais mais promissores para serem aplicados na produção de filmes e coberturas comestíveis. Prolongam a vida de prateleira de frutas e hortaliças, devido à seletiva permeabilidade destes polímeros para O₂ e CO₂, modificando o ambiente interno de frutas, atrasando a senescência (SHIGEMATSU, 2017).

4.5.1 Alginato

Os alginatos são polissacarídeos indigestos e de ocorrência natural comumente produzidos e refinados a partir de vários gêneros de algas marrons (principalmente *Laminaria hyperborean*, *Macrocystispyrifera*, *Ascophyllum nodosum*). A estrutura molecular dos alginatos é composta de copolímeros lineares binários não-ramificados de ácido β -D-manurônico e de ácido α -L-ácido gulurônico ligados por 1-4 ligações glicosídicas. A *Food and Drug Administration* (FDA) classifica alginato de sódio de grau alimentício como substância geralmente considerada segura e lista seu uso como agente emulsificante, estabilizante, espessante e gelificante, assim sendo amplamente utilizado em setores alimentícios (PARREIDT *et al*, 2018).

As características do alginato, em particular, dependem da sua massa molecular e da proporção e disposição dos monômeros de ácido manurônico e gulurônico presentes, sendo esses aspectos dependentes da variedade da alga marinha da qual o alginato é extraído, ou seja, diferentes algas produzem alginatos que diferem na composição e estrutura, e também das condições sazonais e de crescimento da própria alga. Apresenta biodegradabilidade, biocompatibilidade e ausência de toxidez. É adicionado em diversos produtos alimentícios, devido a sua ação gelificante e espessante. Portanto, é necessário o conhecimento das propriedades estruturais e sensoriais do gel para melhor adequar aos alimentos, pois são pontos decisivos na aceitabilidade e escolha do consumidor. Os pesos moleculares da maioria dos alginatos variam entre 32.000 e 400.000 g/mol. A viscosidade das soluções de alginato de sódio aumenta à medida que aumenta a massa molecular e diminui o pH, alcançando máxima viscosidade no pH 3,0-3,5 (SHIGEMATSU, 2017).

Filmes e coberturas de alginato de sódio são barreiras deficientes à umidade, devido ao seu caráter hidrofílico. Entretanto, a incorporação de cálcio reduz sua permeabilidade ao vapor de água, através da reticulação, tornando os filmes de alginato insolúveis. Do mesmo modo, a incorporação de lipídeos, como emulsão ou camada de revestimento na formação dos filmes, melhora

significativamente suas propriedades de barreira ao vapor d'água (SHIGEMATSU,2017).

4.5.2 Ágar-ágar

De origem asiática, o ágar-ágar forma uma gelatina de origem vegetal, muito rica em fibra solúvel (94,8%) e minerais, ideal para espessar e gelificar alimentos sem alterar ou adicionar qualquer sabor. O seu poder de gelificação é 10 vezes superior ao da gelatina de origem animal. Apresenta como um fitocolóide com característica não celulósica, que pode ser extraído da parede celular de diversos gêneros e espécies de algas marinhas vermelhas, as Agarófitas pertencentes à classe Rodophyta (CORREIA, 2016).

A composição do ágar-ágar se mostra como uma mistura heterogênea de agarose e a agarpectina. A mistura desses dois polissacarídeos confere propriedades importantes ao ágar-ágar, como o alto poder geleificante, elevada força gel e alta transparência. Sua propriedade de formar gel atóxico ocorre devido aos três átomos de hidrogênio em sua estrutura, que limitam a formação de uma hélice pela molécula. O ágar-ágar, por ser insolúvel em água fria e capaz de absorver uma capacidade de água 20 vezes o seu peso, expandindo consideravelmente. Ele ainda possui em sua composição fibras, celulose, nidrogalactose, baixa quantidade de proteínas e sais minerais (CORREIA, 2016).

A força do gel do ágar-ágar está diretamente influenciada por fatores químicos, como concentração, pH do meio, conteúdo de açúcar e viscosidade. No entanto, a força apresentada pelo gel varia inversamente ao valor do pH, assim, quanto maior o pH do meio, menor a força apresentada pelo gel. Quando analisada em temperatura ambiente e com o decorrer do tempo, a viscosidade tende a aumentar apresentando temperatura de fusão de 85°C a 95°C e temperatura de geleificação de 32°C a 45°C (RAGHAV, 2016; FERREIRA, 2015).

A fração geleificante do ágar-ágar possui uma estrutura de dupla hélice. Esta estrutura agrega-se para formar uma estrutura tridimensional que retém as moléculas de água nos seus interstícios, formando assim géis termo reversíveis. A propriedade de geleificação do ágar-ágar é devida aos três átomos de

hidrogênio equatorial nos resíduos de 3,6- anidro-L-galactose, que limitam a molécula para formar uma hélice. A interação das hélices causa a formação do gel (FERREIRA, 2015).

A viscosidade de uma solução de ágar-ágar é influenciada e dependente da fonte da matéria-prima. A viscosidade às temperaturas acima do seu ponto de geleificação é relativamente constante em pH de 4,5 a 9,0 e não é muito afetada por idade ou força iônica dentro da gama de pH de 6,0 a 8,0. Entretanto, iniciada a geleificação, à temperatura constante, a viscosidade aumenta com o tempo. Geralmente, a viscosidade é menor a medida que a força do gel aumenta. O peso molecular médio do ágar-ágar varia entre 8,000 até mais de 100,000. (CORREIA, 2016; ADIVITOS & INGREDIENTES, 2012).

Em seu estado natural, o ágar-ágar ocorre como carboidrato estrutural da parede celular das algas agarófitas, existindo na forma de sais de cálcio ou uma mistura de sais de cálcio e magnésio. É uma mistura heterogênea de dois tipos de polissacarídeos, que embora citados anteriormente serão caracterizados na sequência: a agarose, um polímero neutro, e a agarpectina, um polímero com carga sulfatado. A agarose, fração geleificante, é uma molécula linear neutra, essencialmente livre de sulfatos, que consiste em cadeias repetidas de unidades alternadas β -1,3 D-galactose e α -1,4 3,6-anidro-L-galactose. A agarpectina, fração não-geleificante, é um polissacarídeo sulfatado (3% a 10% de sulfato) composto de agarose e porcentagens variadas de éster sulfato, ácido D-glucurônico e pequenas quantidades de ácido pirúvico. A proporção destes dois polímeros varia de acordo com a espécie da alga, sendo que a agarose é o componente principal, representando cerca de 70% do total (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2012).

O ágar-ágar pode apresentar-se em diversas formas: pó, flocos, barras e fios. Para aplicações industriais, ágar-ágar em pó é o mais utilizado. As formas de flocos, barras e fios são mais utilizadas para fins culinários. A produção de ágar-ágar em pó e em flocos pode ser realizada por dois métodos: gel-press ou precipitação em solventes. No entanto, o método de precipitação em solventes não é muito utilizado atualmente pelo seu alto custo e baixa eficiência. O ágar-ágar em forma de barras e fios é produzido por um sistema tradicional mais artesanal (ADITIVOS; INGREDIENTES, 2012).

5 Projeto de Pesquisa

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



Desenvolvimento e avaliação de coberturas bioativas comestíveis para morangos com óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e laranja doce (*Citrus aurantium* var. *Dulcis*) com propriedades antimicrobianas.

Gabriela Venturini Antunes

Pelotas, 2019

Gabriela Venturini Antunes

Desenvolvimento e avaliação de coberturas bioativas comestíveis para morangos com óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e laranja doce (*Citrus aurantium* var. *Dulcis*) com propriedades antimicrobianas

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

Orientador: Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra

Co-Orientador (es):

Profa. Dra. Marcia Arocha Gularte

Profa. Dra. Tatiane Kuka Valente Gandra

Pelotas, 2019

Banca Examinadora:

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

Prof^a. Dra. Jozi Fagundes de Mello – Faculdade de Nutrição – UFPel (Titular)

Prof^a. Dra. Simone Pieniz - Faculdade de Nutrição – UFPel (Suplente)

Resumo

O morango é uma fruta que possui uma curta vida útil após a colheita. Dentre os fatores responsáveis pela perda de qualidade dos morangos estão a alta atividade metabólica e alta susceptibilidade ao ataque microbiano. O objetivo no presente trabalho será estudar o efeito da aplicação de coberturas comestíveis com base de gelatina, alginato e ágar-ágar com adição de óleo essencial de tomilho e laranja doce, avaliando o efeito das coberturas nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais determinantes da vida útil de morangos nos tempos de 1, 7 e 15 dias após elaboração do produto. Será também avaliado o efeito frente à bactéria *Listeria monocytogenes* em morangos artificialmente contaminados com este microrganismo. Serão realizadas as análises físico-químicas de determinação do pH, acidez titulável, perda de massa e sólidos solúveis. Quanto às análises microbiológicas serão quantificadas bactérias aeróbias mesófilas, bactérias psicrófilas, fungos, coliformes totais e termotolerantes. A análise de *Listeria monocytogenes* será a verificação da sua presença ou ausência nas amostras artificialmente contaminadas em tempos diferentes de armazenamento. A análise sensorial será realizada conforme o método de dominância temporal das sensações a fim de, avaliar a atributos como textura, aroma e sabor em relação às características gerais dos morangos com coberturas comestíveis adicionada de óleo essencial de tomilho ou de laranja doce.

Palavras-chave: vida útil, coberturas comestíveis, propriedades antimicrobianas, listeriose.

1.Introdução

O consumo de frutas tem aumentado em todo o mundo em função de alterações nos hábitos de vida da sociedade moderna, que a cada dia busca-se uma alimentação mais saudável. Frutas prontas para consumo ou que exigem pouco ou nenhum preparo para serem consumidas com segurança, estão sendo cada vez mais demandadas, principalmente pela conveniência e praticidade que estes produtos oferecem, tanto na hora de comprar quanto na hora de consumir (ALVES *et al*, 2011, ANTUNES *et al*, 2012).

Nas últimas décadas, o aumento de infecções por alimentos tem sido preocupação mundial das organizações responsáveis pela saúde pública. A epidemiologia de doenças causadas por microrganismos presentes em alimentos tem mudado, em função de fatores como aumento da suscetibilidade da população, mudanças no comportamento alimentar e aparecimento de microrganismos emergentes e reconhecidos como patógenos, que estão envolvidos na produção, processamento e distribuição de alimentos (GOMEZ-ALDAPA *et al*, 2017).

O morango é uma fruta muito tradicional que pode ser consumida *in natura* ou em diversas preparações, tais como caldas, iogurtes, bebidas, biscoitos e sorvetes, entre outras. Além de ter uma produção sazonal, é uma fruta muito delicada com alta taxa respiratória, sendo, por isso, altamente perecível (CASTRICINI *et al*,2017). A comercialização de morangos a grandes distâncias é dificultada devido à sua elevada perecibilidade, decorrente principalmente devido suscetibilidade ao desenvolvimento de agentes microbianos,inclusive patogênicos (CUNHA JUNIOR *et al*, 2012).

Listeria ssp., é um gênero bacteriano que inclui espécies patogênicas que se encontram amplamente distribuídas na natureza, já tendo sido isoladas de uma grande variedade de locais e veiculadas ao homem, principalmente pelos alimentos. Dentre suas espécies *L. monocytogenes* é a espécie patogênica para o homem e causa a listeriose, que é uma infecção alimentar severa, com alta taxa de mortalidade. É comumente associada com matéria vegetal e solo e foi sugerido que pode ser mais comum em frutas e vegetais cultivados em estreita associação com o solo (SIQUEIRA, 2013).

Conhecendo-se a ampla distribuição de *L. monocytogenes* na natureza, sua patogenicidade, capacidade de sobreviver mesmo em alimentos refrigerados e a importância em relação à saúde pública, torna-se necessário a elaboração de medidas eficazes no controle da contaminação (SIQUEIRA, 2013).

Nesse sentido a fim de, minimizar contaminantes patógenos tem sido utilizado óleos essenciais como ação antimicrobiana, visando à inibição do crescimento desses microrganismos em alimentos. Estes compostos atuam na membrana plasmática, levando ao vazamento de substratos citoplasmáticos, resultando em morte celular, podendo ser um importante aliado na conservação de frutas (MIYAGUE *et al*, 2013).

Uma tecnologia alternativa cada vez mais utilizada e avaliada como um procedimento viável para elevar o tempo de vida de frutas, é o emprego de coberturas comestíveis. Esses revestimentos têm por objetivo apresentar uma atuação funcional e coadjuvante, contribuindo para a preservação da textura e do valor nutricional, reduzindo as trocas gasosas superficiais e a perda ou ganho excessivo de água. Ao promover alterações na permeação e, por conseguinte, alterar a atmosfera interna, essas coberturas têm sido indicadas, principalmente, para produtos com alta taxa de respiração (ASSIS; BRITTO, 2014).

Raros são os estudos onde os óleos essenciais são aplicados diretamente em alimentos, principalmente pela limitação sensorial de sua aplicação, as quais modificam significativamente o sabor e o aroma do produto. Desse modo, uma opção para a utilização direta seria a inclusão de óleos essenciais em filmes ou coberturas comestíveis bioativas, que permitissem a ação do óleo sem alterar significativamente as características sensoriais do produto (DANNENBERG *et al.*, 2017).

Com o propósito de testar a potencialidade de coberturas bioativas a base de gelatina, ágar-ágar e alginato, incorporadas com óleo essencial de tomilho e óleo essencial de laranja doce, idealizou-se aplicá-las em morangos de forma a manter as características físico-químicas, inibir o desenvolvimento fúngico e bacteriano e avaliar o potencial antimicrobiano frente à *Listeria monocytogenes*.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e aplicar coberturas comestíveis bioativas a base de ágar-ágar e alginato adicionadas de óleos essenciais de tomilho e óleo de laranja doce em morangos com propriedades antimicrobianas especialmente anti-*Listeria monocytogenes*.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver coberturas bioativas a base de gelatina adicionada de óleo essencial de tomilho e óleo essencial de laranja doce;
- Desenvolver coberturas bioativas a base de ágar-ágar adicionadas de óleo essencial de tomilho e óleo essencial de laranja doce;
- Desenvolver coberturas bioativas a base de alginato adicionadas de óleo essencial de tomilho e óleo essencial de laranja doce;
- Aplicar as coberturas bioativas em morangos e avaliar as características físico-químicas e microbiológicas;
- Verificar a aceitação do produto para o consumo através da análise sensorial;
- Aplicar as coberturas bioativas em morangos e avaliar a atividade antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes*.

2. Hipóteses

Coberturas bioativas de ágar-ágar e alginato com adição de óleo essencial de tomilho e óleo essencial de laranja doce mantêm as características físico-químicas e inibem o desenvolvimento de bactérias e fungos em morangos.

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

Morangos com coberturas bioativas de ágar-ágar e alginato incorporados com óleo essencial de tomilho e óleo essencial de laranja doce, apresentam efeito antimicrobiano frente à *Listeria monocytogenes*.

3. Revisão Bibliográfica

Frutas prontas para consumo ou que exigem pouco ou nenhum preparo para serem consumidas com segurança, estão sendo cada vez mais demandadas, principalmente pela conveniência e praticidade que estes produtos oferecem, tanto na hora de comprar quanto na hora de consumir (ANTUNES *et al* 2012; ALVES *et al*, 2011).

As frutas desempenham um papel muito importante em nossa alimentação, são fontes naturais de nutrientes, vitaminas e sais minerais, além de fornecerem fibras e outros nutrientes que contribuem para a prevenção de doenças.

Entre as frutas que apresentam bastante aceitação entre mercado consumidor está o morango, não apenas pelo seu sabor, mas também em razão do seu valor nutricional. Na seção que se segue entramos detalhamos de forma mais específica os aspectos que envolvem essa fruta, tema do presente trabalho.

4.1 O morango

O morango é cultivado em diversos países e, no Brasil, alcança uma produção de 8.926 kg/ha (FAO Stat, 2018) concentrando a sua maior produção em estados abrangidos por regiões de clima temperado e subtropical, que oferecem as melhores condições para seu desenvolvimento, como de Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina (OLIVEIRA; SCIVITTARO, 2009).

Os morangos são benéficos para a dieta humana como fonte de macro e micronutrientes, vitaminas e antioxidantes promotores de saúde (GIAMPIERI *et al.*, 2015). O morangueiro é uma planta pertencente à família das Rosáceas, que possui espécies frutíferas de interesse econômico. É das regiões de clima temperado da Europa e das Américas. A espécie de morangueiro produzida comercialmente nos dias de hoje é um híbrido natural, resultante de um cruzamento casual entre duas espécies americanas levadas à França (ANTUNES *et al*, 2011). É uma planta herbácea perene, com caules curtos

(coroas) e folhas densamente espaçadas. O morango produz frutas acessórias e agregadas complexas compostas por aquênios e um receptáculo. Os aquênios são pequenos frutos secos, de semente única, enquanto o receptáculo é considerado anatomicamente equivalente ao tecido do meristema floral (HOLLENDER *et al.*, 2012).

Assim como a framboesa, mirtilo e *gojiberry*, o morango pertence ao grupo das frutas vermelhas, também conhecido por *berries*. Esse grupo se caracteriza por frutas ricas em vitaminas (A, C, E e do complexo B), minerais, compostos fenólicos (ácido elágico e gálico) e flavonóides (catequinas, quercetinas e antocianinas), sendo atribuídas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes nessas frutas (CARDOZO; MAFRA, 2015).

É classificado como fruto não-climatérico e possui alta taxa respiratória, sendo assim, é muito perecível e tem curto tempo de vida pós-colheita. O ponto de maturação do fruto durante a colheita é de essencial importância, pois influencia diretamente na palatabilidade e aparência do fruto e, conseqüentemente, na aceitação pelo consumidor (GONÇALVES *et al.*, 2012).

De acordo com Chitarra e Chitarra (1990) o morango alcança, após sua colheita, uma vida de até 10 dias se atendidas suas necessidades de temperaturas entre 0-5 °C, com 10% de Oxigênio e 15-20% de CO₂.

Em decorrência do grau de exigência desses frutos durante seu armazenamento e a dificuldade de certos comércios manterem este controle, a intensa atividade metabólica do morango, associada a sua suscetibilidade frente à ação de microrganismos, apresenta uma vida de prateleira relativamente mais curta do que o esperado.

O morango é afetado por vários patógenos, incluindo fungos, bactérias, vírus e nematoides. Os patógenos economicamente mais impactantes do morango são os fungos, principalmente *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium digitatum* e *Botrytis cinerea*, que podem infectar todas as partes da planta e causar danos graves ou a morte do fruto (GARRIDO *et al.*, 2011).

O morango é muito conhecido pelo seu sabor doce e propriedades sensoriais, e tem sido observado seus efeitos no tratamento de doenças crônicas como câncer e doenças cardíacas, além de ser uma fonte importante de algumas vitaminas como a vitamina C, vitamina A e folatos. A cor é provavelmente o

atributo de aparência mais importante no morango, sendo causado pelo acúmulo de antocianinas. Açúcares são implicados no sabor da fruta e determinam o valor calórico dos morangos. Ácidos orgânicos estão envolvidos no sabor, textura, pH e cor dos morangos, alterando a qualidade desta fruta (DIEL et al, 2018; ORNELAS-PAZ, 2015; GIAMPIERI et al, 2012).

Nutricionalmente, o morango apresenta características relevantes à saúde do consumidor. Em razão do elevado percentual de fibras tem potencial para reduzir a glicemia sanguínea, além de ter efeito de saciedade. Em menor grau são fontes de ácidos graxos essenciais, já que o óleo de semente de morango é rico em ácidos graxos insaturados. Por possuir grandes quantidades de vitamina C, o morango é uma fonte importante para nutrição humana. É considerado também um alimento fonte de folato e apresenta cerca de 20 a 25g/100g e manganês fornecendo mais de 20% da ingestão diária adequada, além de ser uma fonte de várias outras vitaminas, como a tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6, vitamina K, vitamina A e vitamina E (GIAMPIERI et al, 2012).

Durante o período de amadurecimento do morango ocorrem diversas transformações, caracterizadas por alterações fisiológicas e bioquímicas como mudança de cor, melhoria da aparência, redução da firmeza de polpa, perda de peso, aumento dos teores de sólidos solúveis totais e diminuição do teor de acidez total titulável. Tais indicadores servem como parâmetro de qualidade dos frutos (PRATES; ASCHERI, 2011).

O morango é altamente perecível, de modo geral apresenta uma taxa respiratória de aproximadamente de 6 mg a 10 mg de CO₂/kg.h a 0°C, a qual aumenta de quatro a cinco vezes quando a temperatura sobe para 10°C, e até dez vezes se a temperatura alcança 20°C (MITCHAM et al., 2003). Em decorrência dessa alta perecibilidade, a comercialização e a disponibilidade de morangos são restritas. A rápida deterioração dos frutos e as doenças pós-colheita acarretam perdas consideráveis, qualitativas e econômicas. A contaminação microbiológica, injúrias mecânicas, desidratação e perda de turgor estão entre os principais fatores limitantes da vida útil dos morangos.

Dessa forma, tecnologias estão sendo estudadas com o objetivo de prolongar a sua vida útil. Como os frutos de morango são consumidos preferencialmente *in natura* torna-se interessante a utilização de material

biodegradável e comestível para aumentar seu período de comercialização, sem que seja alterado o sabor, a cor e o aroma dos frutos (GARCIA, 2006; PRATES E ASCHERI, 2011)

O processamento mínimo, em razão do manuseio e do aumento de injúrias mecânicas, resulta na perda da integridade celular e consequente dano à compartimentalização de enzimas e substratos, contribuindo para reações de escurecimento e formação de metabólitos secundários envolvidos na produção de odores desagradáveis favorecendo também a contaminação de frutas por microrganismos, inclusive patogênicos, que por sua vez aceleram a degradação e a perda de qualidade e reduzem o tempo de vida útil dos produtos (SHIGEMATSU, 2017).

A deterioração pós-colheita de frutas é normalmente retardada pelo armazenamento em baixas temperaturas, em atmosferas controladas ou pela utilização de tratamentos que reduzem o metabolismo do produto (GARCIA, 2006).

As embalagens utilizadas para comercialização são recipientes de polietileno tereftalato (PET), geralmente transparentes, ou então bandejas de poliestireno expandido (isopor), cobertas com filme de polivinil cloreto (PVC) maleável ou com tampas perfuradas. Normalmente a capacidade é de 250 a 500gm de morangos, distribuídas em uma ou duas camadas. Durante o armazenamento recomenda-se manter a temperatura da câmara fria de 0 a 1 °C e a umidade relativa entre 90-95% (Embrapa, 2005).

No entanto, não só sob o aspecto da conservação e tempo de prateleira do morango cabe atenção, mas em especial pela importância de se evitar a sua contaminação por agentes patogênicos capazes de produzir doenças nos consumidores.

4.2 Doenças transmitidas por alimentos e os microrganismos

A demanda por frutas e hortaliças com processamento mínimo vem crescendo em especial pelo interesse de consumidores em busca de alimentos saudáveis associados à praticidade e conveniência. De acordo com a Portaria nº. 20 de 2017 da Secretaria da Saúde do estado do Rio Grande do Sul, na

categoria de alimentos minimamente processados (MP) são incluídos os vegetais, ou seja, frutas, legumes, hortaliças, ou suas combinações, que tenham passado por algum tipo de processamento, seja “seleção, corte, fatiamento, lavagem, desinfecção, enxágue, centrifugação, embalagem e armazenamento” (RIO GRANDE DO SUL, ANEXO I, 2017) ou outros que permitam a manutenção de estado fresco, devida qualidade sensorial e que apresente segurança para o consumo.

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorrem pela ingestão de alimentos sólidos ou líquidos contaminados com microrganismos patogênicos que afetam a saúde do consumidor em forma individual ou coletiva. Um aumento nos surtos de doenças transmitidas por alimentos nos últimos anos tem sido associado ao maior consumo de frutas e vegetais frescos. A contaminação bacteriana pode ocorrer em qualquer uma das etapas de processamento, tais como colheita, corte, lavagem, imersão, desidratação, mistura e/ou embalagem destes alimentos (SIQUEIRA, 2013, GOMEZ-ALDAPA *et al*, 2017).

Para redução da contaminação dos alimentos e das notificações de surto de origem alimentar, as boas práticas de manipulação surgem como importante ferramenta de prevenção e como conceito genérico, consiste em procedimentos que devem ser adotados por serviços de alimentação a fim de garantir a qualidade higiênico-sanitária e a conformidade dos alimentos com objetivo de produzir alimentos seguros ao consumidor (SIQUEIRA, 2013).

4.2.1. Microrganismos indicadores da qualidade microbiológica dos alimentos

Há grupos de microrganismos que, por meio de sua avaliação, são capazes de indicar as condições sanitárias e de higiene do processamento e armazenamento dos alimentos, bem como a presença de microrganismos patogênicos, entre outras características. Franco e Landgraf (2005) definem microrganismos indicadores como sendo grupos ou espécies de microrganismos cuja presença no alimento pode informar a respeito da ocorrência de contaminação fecal, presença de patógeno, seu potencial deterioração, indicar más condições sanitárias em alguma das etapas percorridas pelo alimento até chegar ao consumidor (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Bactérias anaeróbias

A presença desses microrganismos indica a ocorrência no alimento de condições favoráveis à multiplicação de patógenos anaeróbios, como o *Clostridium perfringens* ou o *Clostridium botulinum*, por exemplo.

Coliformes totais

São bacilos gram-negativos e não formam esporos. Esse grupo é constituído de bactérias da família *Enterobacteriaceae* que, ao sofrerem incubação entre 35 e 37°C por 48h, são capazes de fermentar lactose produzindo gás.

Os coliformes termotolerantes pertencem aos coliformes totais como um subgrupo desses, específico de bactérias fermentadoras de lactose a temperatura de 44,5 a 45,5°C, com produção de gás. A ocorrência de coliformes termotolerantes em alimentos não configura exatamente uma contaminação de origem fecal, mas pode indicar importantes problemas de higiene durante ou após o processo de fabricação de determinados alimentos.

Em alimentos de origem vegetal, em estado fresco, segundo Franco e Landgraf (2005), o único indicador considerado válido de contaminação fecal é a *E. coli*, tendo em vista a ocorrência natural dos outros indicadores de contaminação fecal nessas espécies de alimentos.

Psicrotróficos

São microrganismos que apresentam capacidade de crescimento a temperatura igual ou inferior a 7°C

Listeriose

Listeria monocytogenes foi reconhecida como agente patogênico após os surtos na década de 80 na América do Norte e Europa, como consequências sérias, invasivas e com risco de morte, além do alto prejuízo econômico tanto para os órgãos públicos quanto para as indústrias, que passaram a demandar maior atenção para o patógeno, ao mesmo tempo se reconheceu o envolvimento

e a importância dos alimentos na cadeia de transmissão da listeriose ao homem (SIQUEIRA, 2013).

O gênero *Listeria* está relacionado filogeneticamente aos gêneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Brochotrix*. Atualmente compreende atualmente, composto por dez espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, e *L. weihenstephanensis* (ZHANG et al., 2007; HALTER, NEUHAUS & SCHERER, 2013). Apenas duas espécies são reconhecidamente patogênicas, assim *L. monocytogenes* pode infectar uma variedade de espécies animais, incluindo o homem e *L. ivanovii* apresenta patogenicidade restrita aos ruminantes (JEYALETCHUMI, 2010).

Listeria monocytogenes é o agente causador da listeriose, uma doença geralmente ligada ao consumo de alimentos contaminados. Historicamente, os alimentos associados a casos de listeriose foram carnes frias e queijos moles, no entanto, uma mudança recente foi observada com um número crescente de surtos ligados a produtos frescos e outros produtos atípicos (BURALL *et al*, 2017).

Esta enfermidade nos seres humanos onde apresenta sintomas que incluem septicemia, meningite, encefalite, infecção cervical ou intrauterina em gestantes, as quais podem provocar aborto ou nascimento prematuro. Gastroenterite com náuseas e vômitos pode proceder ou acompanhar as manifestações nas formas mais graves da doença. Ocorrem principalmente em pessoas pertencentes a grupos de risco, tais como gestantes, idosos, crianças e indivíduos imunossuprimidos devido ao uso de medicamentos como corticosteróides, drogas para câncer, e transplantados. O período de incubação é longo, podendo variar de três a 90 dias, o que dificulta a identificação do patógeno e o rastreamento para identificação do alimento contaminado que tenha causado a doença (SIQUEIRA, 2013).

O diagnóstico pode ser feito pela identificação dos sinais clínicos e sintomas, do isolamento bacteriano de material clínico como sangue, líquido cefalorraquidiano, líquido amniótico, fígado, baço, placenta e feto. A identificação também pode ser feita por imuno-histoquímica e achados histopatológicos (SIQUEIRA, 2013).

A patogênese da listeriose consiste na internalização da bactéria por fagocitose por células não fagocíticas de diferentes tecidos e órgãos. A estratégia de invasão, célula a célula, permite a sua disseminação no interior dos tecidos hospedeiros e a formação de focos infecciosos ficando assim protegidos das defesas do hospedeiro, como os anticorpos circulantes. Cada etapa do parasitismo intracelular por *L. monocytogenes* dependerá da produção de fatores de virulência, exercidos por diversas proteínas que estão envolvidas nas fases do ciclo intracelular. Em relação às outras doenças de origem alimentar a listeriose apresenta uma baixa incidência, mas com índices de mortalidade superiores a 50%. Apesar das outras formas de transmissão, os alimentos têm sido claramente identificados como a mais importante fonte de infecção (ROWLANDS, 2013).

A dificuldade de eliminar estes microrganismos das indústrias é potencializada pelas condições de umidade, temperatura e presença de matéria orgânica nas plantas, que aliadas à habilidade do patógeno em formar biofilmes podem desencadear a colonização de superfícies e equipamentos (SIQUEIRA, 2013).

As altas ocorrências do patógeno em diversos alimentos associada aos altos índices de mortalidade tornam *L. monocytogenes* um importante e complexo problema de saúde pública que tem provocado perdas para a indústria de alimentos devido aos inúmeros recolhimentos, voluntários e obrigatórios, realizados principalmente nos Estados Unidos e Canadá. Estima-se que este patógeno causa aproximadamente 1.460 hospitalizações cada ano nos Estados Unidos (FERREIRA, 2014).

4.2.2 Características de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes é uma bactéria gram-positiva, com diâmetro de 0,4 a 0,5µm e comprimento de 0,51 a 2,0µm, aeróbica, intracelular e anaeróbica facultativa, não formadora de esporos, apresenta motilidade característica em forma de “guarda-chuva” quando incubado em meio de cultura próprio entre 20 a 25°C. As colônias formadas são acinzentadas brilhantes sob iluminação normal e de coloração azul esverdeada quando observadas sob iluminação oblíqua (JEYALETCHUMI *et al*, 2010).

Em relação a suas características bioquímicas, é catalase positiva, oxidase negativa, móvel a 20°C, fermenta a glicose produzindo, principalmente, ácido láctico, apresenta teste positivo para vermelho de metila e Voges-Proskauer. Não utiliza citrato, não produz indol e hidrolisa piruvato de sódio e esculina. Também não hidrolisauréia, gelatina e caseína (SIQUEIRA, 2013).

As necessidades nutricionais são comuns das bactérias gram-positivas. O pH para a multiplicação está na faixa de 6 a 8 podendo crescer também em 4,1 e 9,6. Apresenta crescimento na faixa de 3°C e 45°C classificando a como psicotrópicas, podendo suportar repetidos congelamentos e descongelamentos. Os meios de cultura ideais para seu crescimento são Brain Heart Infusion (BHI) e Ágar Trypticase de Soja (TSA) (SIQUEIRA, 2013, FERREIRA, 2014).

A atividade de água ótima para o crescimento é próxima a 0,97, porém este agente tem a capacidade de se multiplicar em valores próximos a 0,92, que é considerado um valor muito baixo para desenvolvimento de patógenos vinculados por alimentos (SIQUEIRA, 2013).

L. monocytogenes tem habilidade de produzir biofilme e sobreviver por vários meses em ambientes processadores de alimentos. A estrutura do biofilme protege o microrganismo de fatores físicos e químicos (MIYAGUE et al, 2013).

4.2.3 Regulamentações para *L. monocytogenes* em alimentos

Alguns países estabeleceram limites legais para o nível de contaminação de microrganismos permitido em alimentos, especialmente para os produtos prontos para consumo, enquanto outros países têm sugerido procedimentos ou critérios que não tem amparo legal (JAY, 2005).

Os EUA adotaram a política de “tolerância zero”, de modo que a presença de *L. monocytogenes* em 25 gramas de qualquer tipo de alimento pronto para o consumo é considerado inaceitável, caracterizando o impróprio para o consumo humano (MARTINS, 2009).

No Brasil, os padrões microbiológicos para alimentos, estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pela IN 60 de 2019 definiu a ausência de *L. monocytogenes* em 25 gramas somente para alguns queijos. Para os demais alimentos não são contemplados limites específicos para esta bactéria (BRASIL, 2019).

4.3 Óleos essenciais e sua ação antimicrobiana

Óleos essenciais são compostos naturais isolados de plantas aromáticas, e têm sido usados para uma ampla variedade de propósitos como remédios usados na saúde humana como alimentos funcionais, como aditivos alimentares, suplementos nutricionais e fabricação de cosméticos. Os óleos essenciais têm baixa toxicidade em mamíferos e degradam-se rapidamente na água e no solo, tornando-os favoráveis ao meio ambiente. São extraídos de diversas plantas em diferentes lugares (flor, semente, raiz) por diversas técnicas, como por exemplo, extração por solventes, destilação a vapor, sendo este último o mais utilizado em escala de produção comercial, por apresentar 93% de extração, sendo mais barato quando comparado com métodos mais avançados (KAVANAUGH, 2012; GALINDO, 2017).

Alguns óleos essenciais possuem naturalmente a função de antioxidantes e são eficazes para inibir diferentes doenças humanas devido às suas propriedades antirradicais e antimicrobianas. Portanto, a investigação de compostos bioativos particularmente polifenóis de fontes vegetais naturais, incluindo ervas e especiarias tem uma tendência crescente. Óleos essenciais de plantas têm potenciais efeitos benéficos em certas condições de saúde. Estes geralmente reconhecidos como substâncias de natureza segura inibem a oxidação lipídica em alimentos, podendo servir como aditivos naturais em alimentos e produtos alimentícios (KAVANAUGH, 2012; ZENGIN, 2014; ANTUNES *et al*, 2012).

Estes compostos atuam na membrana plasmática de microrganismos, levando ao vazamento de substratos citoplasmáticos, resultando em morte celular. No entanto, a maioria destes compostos altera significativamente os aspectos sensoriais dos produtos alimentícios quando adicionados em doses antimicrobianas eficientes (MIYAGUE *et al*, 2013).

Alguns cientistas relataram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de orégano, tomilho, sálvia, alecrim, cravo, coentro, alho e cebola contra bactérias e fungos. A composição, estrutura, bem como grupos funcionais dos óleos desempenham um papel importante na determinação de sua atividade antimicrobiana. Estes efeitos variam para a conservação de culturas alimentares

armazenadas, em particular, a atividade antimicrobiana de óleos formou a base de muitas aplicações, incluindo a preservação de alimentos crus e processados, assim, prolongando a vida de prateleira destes alimentos (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

O óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) possui uma substância chamada carvacrol, sendo este o principal componente (45%) destes óleos, é capaz de desintegrar a membrana externa de bactérias gram-negativas, liberando lipopolissacarídeos e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática ao ATP. Para bactérias gram-positivas, é capaz de interagir com membranas e alterar a permeabilidade de cátions como H⁺ e K⁺. A remoção do substituinte do anel alifático do carvacrol diminui ligeiramente a atividade antimicrobiana (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

O óleo essencial de laranja doce (*Citrus aurantium var. Dulcis*) encontra-se em grandes quantidades no flavedo da fruta. A casca das frutas cítricas compreende duas camadas, camada externa vermelha como flavedo e camada branca interna como albedo. O flavedo é muito fino e frágil contendo vesículas olíferas no interior que podem ser recolhidos por raspando na camada de flavedo. O flavedo é uma camada interna geralmente incolor e esponjosa de mesofilo que muda de caráter e espessura ao longo do desenvolvimento da fruta, propriedades que determinar facilidade de *peeling*. O albedo, deitado sob o flavedo consiste em células semelhantes a tubulações unidas para formar a massa de tecido comprimida na área intercelular. O albedo é rico em flavonóides, que, se transferidos para o suco, confere gosto amargo (ETEBU; NWAUZOMA, 2014).

Os óleos essenciais são uma mistura de compostos voláteis e consistem principalmente de hidrocarbonetos monoterpenos. Óleos cítricos são uma mistura de mais de três compostos: hidrocarbonetos terpênicos, compostos oxigenados e compostos não voláteis. A fração terpeno pode ser de 50 a mais de 95% do óleo; No entanto, faz pouca contribuição para o sabor e fragrância do óleo (ALI *et al*, 2012).

Utilizado também como componente ativo para aplicação em embalagens de alimentos, os óleos essenciais aumentam significativamente a barreira de vapor de água, devido a sua característica hidrofóbica. A utilização de óleos

essenciais em alimentos deve ser cautelosa, pelo fato de que o excesso de compostos aromáticos no alimento acarretará características sensoriais indesejáveis (GALINDO, 2017).

Há a necessidade de minimizar os riscos de contaminação de alimentos, no entanto, os consumidores estão exigindo produtos levemente processados que mantenham seu sabor e vida útil prolongada. Assim, o uso de conservantes naturais que poderiam evitar o crescimento microbiano em alimentos é uma tendência atual (MIYAGUE *et al*, 2013).

4.4 Coberturas comestíveis

As coberturas comestíveis estão sendo amplamente testadas em função de poderem, potencialmente, aumentar a vida útil das frutas. Podem ser definidas como uma fina camada, aplicada sobre o produto, que, em função de sua permeabilidade aos gases, vapor de água e solutos, reduz o metabolismo do produto, podendo assim, prolongar sua vida útil e sua ação antimicrobiana (GARCIA, 2006; PARREIDT *et al*, 2018, ANTUNES *et al*, 2012).

Como objetivo as coberturas comestíveis podem apresentar uma atuação funcional e coadjuvante, contribuindo para a preservação da textura e do valor nutricional, reduzindo as trocas gasosas superficiais e a perda ou ganho excessivo de água. Ao promover alterações na permeação e, por conseguinte, alterar a atmosfera interna, essas coberturas têm sido indicadas, principalmente, para produtos com alta taxa de respiração. São aplicadas ou formadas diretamente sobre a superfície das frutas, configurando membranas delgadas, imperceptíveis a olho nu e com diversas características estruturais, que são dependentes da formulação da solução filmogênica precursora. Como estas coberturas passam a fazer parte do alimento a serem consumidos, os materiais empregados em sua formação devem ser considerados como atóxicos e seguros para o uso em alimentos. (ASSIS; BRITTO, 2014).

As coberturas podem atuar como veículos para uma ampla quantidade de aditivos alimentares, incluindo agentes anti-escurecimento, corantes, aromatizantes, nutrientes, especiarias e diversos compostos antimicrobianos que estenderiam a vida de prateleira desses produtos e reduziriam o risco de

crescimento de patógenos na superfície dos alimentos. As substâncias mais utilizadas na elaboração de filmes e coberturas comestíveis são as proteínas (gelatina, caseína, ovo albumina, glúten de trigo e proteínas miofibrilares) e os polissacarídeos (amido e seus derivados, pectina, celulose e seus derivados, alginato) e os lipídios (monoglicerídeos acetilados, ácido esteárico, ceras e ésteres de ácido graxo) ou a combinação dos mesmos (SHIGEMATSU, 2017).

Os revestimentos à base de polissacarídeos são considerados um dos materiais mais promissores para serem aplicados na produção de filmes e coberturas comestíveis. Prolongam a vida de prateleira de frutas e hortaliças, devido à seletiva permeabilidade destes polímeros para O₂ e CO₂, modificando o ambiente interno de frutas, atrasando a senescência (SHIGEMATSU, 2017).

4.4.1 Gelatina

A cobertura feita com gelatina é composta por colágeno, que é uma proteína de origem animal cuja forma de apresentação pode ser como fibras ou pó, sendo insolúvel em água devido à grande concentração de aminoácidos hidrofóbicos contidos no interior da proteína. Constituído por aminoácidos em formato de tripla-hélice, o colágeno pode ser caracterizado de acordo com sua obtenção. Apresentam disposição física alongada além de cadeias peptídicas formadas pelos aminoácidos lisina, alanina, hidroxilisina, glicina e prolina, e organizadas paralelamente a um eixo, proporcionando melhores índices de resistência, estabilidade e elasticidade à estrutura, e ainda impedindo a rotação da cadeia (CORREIA, 2016).

A gelatina encontra-se cristalizada com coloração amarelo-palha e é solúvel em água quente e insolúvel em água fria. É uma proteína de digestão fácil e possui vários aminoácidos, menos o triptofano, além de fazer parte da composição de tecidos conectivos de animais. É constituída de prolina, hidroxiprolina e glicina, não-tóxica, biodegradável e de baixo custo. É uma proteína muito utilizada para formação de filmes comestíveis de vegetais e como agente encapsulante de substâncias bioativas além de ser uma boa matriz contra gases, sendo assim são amplamente utilizados nos meios alimentícios a fim de melhorar a preservação dos produtos (GALINDO, 2017).

4.4.2 Alginato

Os alginatos são polissacarídeos indigestos e de ocorrência natural comumente produzidos e refinados a partir de vários gêneros de algas marrons (principalmente *Laminaria hyperborean*, *Macrocystispyrifera*, *Ascophyllum nodosum*). A estrutura molecular dos alginatos é composta de copolímeros lineares binários não-ramificados de ácido β -D-manurônico e de ácido α -L-ácido gulurônico ligados por 1-4 ligações glicosídicas. A *Food and Drug Administration* (FDA) classifica alginato de sódio de grau alimentício como substância geralmente considerada segura e lista seu uso como agente emulsificante, estabilizante, espessante e gelificante, assim sendo amplamente utilizado em setores alimentícios (PARREIDT *et al*, 2018).

As características do alginato, em particular, dependem da sua massa molecular e da proporção e disposição dos monômeros de ácido manurônico e gulurônico presentes, sendo esses aspectos dependentes da variedade da alga marinha da qual o alginato é extraído, ou seja, diferentes algas produzem alginatos que diferem na composição e estrutura, e também das condições sazonais e de crescimento da própria alga. Apresenta biodegradabilidade, biocompatibilidade e ausência de toxidez. É adicionado em diversos produtos alimentícios, devido a sua ação gelificante e espessante. Portanto, é necessário o conhecimento das propriedades estruturais e sensoriais do gel para melhor adequar aos alimentos, pois são pontos decisivos na aceitabilidade e escolha do consumidor. Os pesos moleculares da maioria dos alginatos variam entre 32.000 e 400.000 g/mol. A viscosidade das soluções de alginato de sódio aumenta à medida que aumenta a massa molecular e diminui o pH, alcançando máxima viscosidade no pH 3,0-3,5 (SHIGEMATSU, 2017).

Filmes e coberturas de alginato de sódio são barreiras deficientes à umidade, devido ao seu caráter hidrofílico. Entretanto, a incorporação de cálcio reduz sua permeabilidade ao vapor de água, através da reticulação, tornando os filmes de alginato insolúveis. Do mesmo modo, a incorporação de lipídeos, como emulsão ou camada de revestimento na formação dos filmes, melhora significativamente suas propriedades de barreira ao vapor d'água (SHIGEMATSU, 2017).

4.4.3 Ágar-ágar

De origem asiática, o ágar-ágar forma uma gelatina vegetal, muito rica em fibra solúvel (94,8%) e minerais, ideal para espessar e gelificar alimentos sem alterar ou adicionar qualquer sabor. O seu poder de gelificação é 10 vezes superior ao da gelatina de origem animal. Apresenta-se como um fitocolóide com característica não celulósica, que pode ser extraído da parede celular de diversos gêneros e espécies de algas marinhas vermelhas, as Agarófitas pertencentes à classe Rodophyta (CORREIA, 2016).

A composição do ágar-ágar se mostra como uma mistura heterogênea de agarose e a agarpectina. A mistura desses dois polissacarídeos confere propriedades importantes ao ágar-ágar, como o alto poder geleificante, elevada força gel, alta transparência. Sua propriedade de formar gel atóxico ocorre devido aos três átomos de hidrogênio em sua estrutura, que limitam a formação de uma hélice pela molécula. Por ser insolúvel em água fria e capaz de absorver uma capacidade de água 20 vezes o seu peso, expandindo consideravelmente, o ágar-ágar possui em sua composição fibras, celulose, nidrogalactose, baixa quantidade de proteínas e sais minerais (CORREIA, 2016).

A força do gel do ágar-ágar está diretamente influenciada por fatores químicos, como concentração, pH do meio, conteúdo de açúcar e viscosidade. No entanto, a força apresentada pelo gel varia inversamente ao valor do pH, assim, quanto maior o pH do meio, menor a força apresentada pelo gel. Quando analisada em temperatura ambiente e com o decorrer do tempo, a viscosidade tende a aumentar apresentando temperatura de fusão de 85°C a 95°C e temperatura de geleificação de 32°C a 45°C (FERREIRA, 2015; RAGHAV, 2016).

A fração geleificante do ágar-ágar possui uma estrutura de dupla hélice. Esta estrutura agrega-se para formar uma estrutura tridimensional que retém as moléculas de água nos seus interstícios, formando assim géis termo reversíveis. A propriedade de geleificação do ágar-ágar é devida aos três átomos de hidrogênio equatorial nos resíduos de 3,6- anidro-L-galactose, que limitam a molécula para formar uma hélice. A interação das hélices causa a formação do gel (FERREIRA, 2015).

A viscosidade de uma solução de ágar-ágar é influenciada e dependente da fonte da matéria-prima. A viscosidade às temperaturas acima do seu ponto de geleificação é relativamente constante em pH de 4,5 a 9,0 e não é muito afetada por idade ou força iônica dentro da gama de pH de 6,0 a 8,0. Entretanto, iniciada a geleificação, à temperatura constante, a viscosidade aumenta com o tempo. Geralmente, a viscosidade é menor a medida que a força do gel aumenta. O peso molecular médio do ágar-ágar varia entre 8,000 até mais de 100,000. (CORREIA, 2016; ADITIVOS & INGREDIENTES, 2012).

Em seu estado natural, o ágar-ágar ocorre como carboidrato estrutural da parede celular das algas agarófitas, existindo na forma de sais de cálcio ou uma mistura de sais de cálcio e magnésio. É uma mistura heterogênea de dois tipos de polissacarídeos: a agarose, um polímero neutro, e a agarpectina, um polímero com carga sulfatado. A agarose, fração geleificante, é uma molécula linear neutra, essencialmente livre de sulfatos, que consiste em cadeias repetidas de unidades alternadas β -1,3 D-galactose e α -1,4 3,6-anidro-L-galactose. A agarpectina, fração não-geleificante, é um polissacarídeo sulfatado (3% a 10% de sulfato) composto de agarose e porcentagens variadas de éster sulfato, ácido D-glucurônico e pequenas quantidades de ácido pirúvico. A proporção destes dois polímeros varia de acordo com a espécie da alga, sendo que a agarose é o componente principal, representando cerca de 70% do total (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2012).

O ágar-ágar pode apresentar-se em diversas formas: pó, flocos, barras e fios. Para aplicações industriais, ágar-ágar em pó é o mais utilizado. As formas de flocos, barras e fios são mais utilizadas para fins culinários. A produção de ágar-ágar em pó e em flocos pode ser realizada por dois métodos: gel-press ou precipitação em solventes. No entanto, o método de precipitação em solventes não é muito utilizado atualmente pelo seu alto custo e baixa eficiência. O ágar-ágar em forma de barras e fios é produzido por um sistema tradicional mais artesanal (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2012).

5. Material e Métodos

5.1 Aquisição da amostra

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

Quadro 1 Delineamento experimental

Estudo	Variáveis	
	Independentes	Dependentes
Coberturas adicionadas de óleos essenciais em tempos de armazenamento	Cobertura Ágar-ágar Gelatina Alginato de sódio	Isolamento e/ou quantificação de microrganismos Coliformes Totais e termotolerantes Psicrotróficos Bolores e Leveduras Bactérias Aeróbias Mesófilas <i>Listeria monocytogenes</i> Análises físico-químicas pH Acidez Titulável Sólidos Solutos Perda de massa
	Óleo Essencial Tomilho Laranja doce	
	Tempo de armazenamento Logo após o preparo Sete dias Quinze dias	Análise sensorial Teste dominância temporal das sensações

5.2 Elaboração das coberturas

Para a elaboração das coberturas será utilizada gelatina em pó, ágar-ágar e alginato de sódio.

5.2.1 Preparação, aplicação e avaliação de coberturas adicionadas de óleo essencial

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

5.2.2 Preparação da solução filmogênica para cobertura

A solução filmogênica de gelatina será preparada de acordo com a metodologia proposta por GALINDO, 2017 com concentração de gelatina (4%*m/v*), óleo essencial (1,5%), glicerol (1,0%) e Tween - 0,1%. Será dissolvida a gelatina com adição do glicerol sob agitação magnética e aquecimento à 55°C por 35min. Posteriormente será feita a mistura das duas soluções, na proporção de 1:1, com incorporação do óleo essencial de tomilho ou laranja doce e Tween 80 e será homogeneizada por 4min.

A solução filmogênica de ágar-ágar comestível será preparada de acordo com a metodologia proposta por Giménez *et al.* (2013) e Rocha *et al.* (2016), com algumas modificações. Os filmes serão elaborados com 1,5g de ágar-ágar comestível em 100ml de água destilada sob agitação constante a 90°C durante 30min. Após, será adicionado o glicerol, como plastificante (1%; *g/100g* de ágar) e homogeneizado durante 20min. Para a obtenção dos filmes incorporados com os óleos essenciais, será adicionado 0,1g de óleo essencial, após o aquecimento da solução filmogênica (SF) de ágar a 40°C e homogeneizados durante 5min, após será realizada secagem a 40°C durante 16h.

A solução filmogênica de alginato será preparada de acordo com a metodologia proposta por SHIGEMASU (2017) com concentração de alginato de

sódio (1,5% m/v), óleo essencial de tomilho (1,5%); glicerol (0,75%) e tween80 (0,05%).

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

5.2.3 Aplicação das soluções filmogênicas adicionadas de óleos essenciais de tomilho e óleo essencial de laranja doce

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

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

Quadro 2 Tratamentos aplicados

Tratamento	Descrição
1	Morangos preparados, com cobertura de gelatina com óleo essencial de tomilho
2	Morangos preparados, com cobertura de gelatina com óleo essencial de laranja doce
3	Morangos preparados, com cobertura de gelatina sem óleo essencial
4	Morangos preparados, com cobertura de ágar-ágar com óleo essencial de tomilho
5	Morangos preparados, com cobertura de ágar-ágar com óleo essencial de laranja doce
6	Morangos preparados, com cobertura de ágar-ágar sem óleo essencial
7	Morangos preparados, com cobertura de alginato com óleo essencial de tomilho
8	Morangos preparados, com cobertura de alginato com óleo essencial de laranja doce
9	Morangos preparados com cobertura de alginato sem óleo essencial

10	Morangos preparados sem cobertura e sem óleo essencial (grupo controle)
-----------	---

5.3 Avaliação dos morangos com soluções filmogênicas adicionadas de óleo essencial

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

5.3.1 Avaliações Físico-químicas dos morangos com soluções filmogênicas adicionadas de óleo essencial

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

pH

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

Acidez Titulável

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

Perda de massa

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

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

Sólidos solúveis

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

5.3.2 Avaliações microbiológicas dos morangos com soluções filmogênicas adicionadas de óleo essencial

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

Contagem de bolores e leveduras

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

Contagem de bactérias aeróbias mesófilas

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

Contagem de bactérias psicotróficas

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

Enumeração de coliformes totais e termotolerantes

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

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

5.3.3 Avaliação sensorial dos morangos com soluções filmogênicas adicionadas de óleo essencial

A análise sensorial será utilizado o método de dominância temporal das sensações proposto inicialmente por Pineau *et al.* (2003), sendo este um método descritivo temporal onde vários atributos sensoriais são avaliados ao longo do tempo de ingestão do alimento como textura, aroma e sabor dos morangos com coberturas comestíveis adicionados de óleos essenciais.

A análise sensorial será realizada após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pelotas.

5.4 Avaliações do potencial antimicrobiano frente à *Listeria monocytogenes*

Os morangos sem cobertura (controle positivo) e com adição das coberturas com óleos essencial serão submetidos avaliação da atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*. As amostras serão experimentalmente contaminadas, serão adicionados separadamente inóculos de 1ml (padronizados na concentração D.O 0,5 na escala de McFarland que equivale $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹) de *Listeria monocytogenes*. Os produtos depois de elaborados de acordo com os tratamentos listados a seguir serão armazenados por até 15 dias a ≤ 7 °C. A partir de cada um dos produtos será retirada uma amostra de 25 g em três tempos, logo após a elaboração do produto, sete dias após a elaboração do produto e quinze dias após a elaboração e submetidas à avaliação da presença de *Listeria monocytogenes*.

Para correta avaliação serão realizados os seguintes tratamentos

Quadro 3 Tratamentos aplicados

Tratamento	Descrição
1	Morangos preparados, com cobertura de gelatina com óleo essencial de tomilho
2	Morangos preparados, com cobertura de gelatina com óleo essencial de laranja doce
3	Morangos preparados, com cobertura de gelatina sem óleo essencial
4	Morangos preparados, com cobertura de ágar-ágar com óleo essencial de tomilho
5	Morangos preparados, com cobertura de ágar-ágar com óleo essencial de laranja doce
6	Morangos preparados, com cobertura de ágar-ágar sem óleo essencial
7	morangos preparados, com cobertura de alginato com óleo essencial de tomilho
8	Morangos preparados, com cobertura de alginato com óleo essencial de laranja doce
9	Morangos preparados com cobertura de alginato sem óleo essencial
10	Morangos preparados sem cobertura e sem óleo essencial (grupo controle)

5.5 Análise estatística

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

6. Resultados e impactos esperados

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

7. Cronograma de atividades

As atividades serão realizadas de acordo com o exposto no Quadro 2.

Quadro4 Cronograma

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

8. Orçamento

O orçamento será realizado com recursos do PROAP-CAPES, e dos orientadores oriundos de outras fontes de financiamento, conforme exposto no Quadro 5.

Quadro 5 Orçamento do projeto

Descrição	Quantidade	Valor Total (R\$)
Cloreto de Sódio (NaCl)	500 g	13,90
Gelatina em pó	500g	76,70
Alginato de sódio	250g	61,90
Ágar-ágar em pó	500g	247,00
Glicerol	500ml	28,90
Tween 80 (Polisorbato)	1l	95,70
Solução fenolftaleína	1kg	32,00
Hidróxido de sódio (NaOH) 0,1	500 g	12,90
Ágar Batata Dextrose (BDA)	500 g	235,00
Ácido tartárico a 10%,	500 g	25,00
Plate Count Agar (PCA)	500 g	345,00
Caldo Lauril Sulfato de Sódio	500 g	265,00
Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante	500 g	440,00
Caldo <i>Escherichia coli</i>	500 g	-
Fita indicador Ph	1cx	27,50
Placa de Petri Descartável 90x15mm	Pct	3,95
TOTAL		1910,45

Referências

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

ADITIVOS & INGREDIENTES. **Ágar ou ágar-ágar, o mais antigo ficocolóide**, 2012, ed 87, 31-30p. Disponível em: http://insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/87.pdf Acesso em: 27 mai. 2019.

ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise** São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ALDAPA, C. A. G., TORRES, L. A. P., IBARRA, J. R. V. G., VARGAS, E. R., JURADO, A. T., ALVEZ, A. C. G., ROSAS, J. C. Survival of food borne bacteria on strawberries and antibacterial activities of Hibiscus sab dariffa extracts and chemical sanitizers on strawberries. **Journal of food safety**, 2017.

ALI, J.; KHAN, A.; ULLAH, N.; AMIN, A.; RAHMAN, Z.; KHAYAM, S. M. U.; KHAN, F. A.; HUSSAIN, A.; KHURRAM, M.; QUARASHI, M. N. A. Essential oil chemical composition and Antimicrobial Activity of Sour Oranges (*Citrus aurantium*) Peels. **Journal of Pharmacy Research** Vol.5 Issue3.March 2012.

ALVES, A. I.; SARAIVA, S. H.; LUCIA, S. M. D.; TEIXEIRA, L. J. Q.; JUNQUEIRA, M. S. Qualidade De Morangos Envolvidos Com Revestimento Comestível Antimicrobiano À Base De Diferentes Fontes De Amido. **Centro Científico Conhecer- Goiânia**, vol.7, N.13; 2011.

ANTUNES, M. D., GAGO, C. M., CAVACO, A. M., MIGUEL, M. G. Edible Coatings Enriched with Essential Oils and their Compounds for Fresh and Fresh-cut Fruit. **Recent Patents on Food, Nutrition&Agriculture**, 4, 114-122. 2012.

ASSIS, O.B. G., BRITTO, D. Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações. **Brazilian Journal of Food Technology. Campinas**, v. 17, n. 2, p. 87-97, abr./jun. 2014.

BRASIL, Resolução-Rdc Nº 12, De 02 De Janeiro De 2001. Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffdd-f6-3767-4527-bfac-740a0400829b

BURALL, L. S., GRIM, C. J., DATTA, A. R. A clade of *Listeria monocytogenes* serotype 4b variant strains linked to recent listeriosis outbreaks associated with produce from a defined geographic region in the US. **Plos one**,12(5), 2017.

CARDOZO, L; MAFRA, D. Alimentação pode levar a benefícios para o Sistema cardiovascular: fato ou ficção? **Internacional Journal of Cardiovascular Sciences**. v.28, n. 2, p. 87-88, 2015.

CELIKEL, N., KAVA, G. Antimicrobial Properties of Some Essential Oils against Some Pathogenic Microorganisms. **Czech J. Food Sci.** Vol. 26, No. 3: 174–181, 2008.

Center for Diseases and Control (CDC). Fruit and Vegetable Safety, 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/communication/steps-healthy-fruits-veggies.html> Acesso em 9 de maio de 2021.

Center for Diseases and Control (CDC). The Listeria Initiative, 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/surveillance/listeria-initiative.html> Acesso em 3 de maio de 2021.

DIEL, M. I., PINHEIRO, M. V. M., THIESEN, L. A., ALTÍSSIMO, B. S., HOLZ, E., SCHIMIDT, D. Cultivation of strawberry in substrate: Productivity and fruit quality are affected by the cultivar origin and substrates. **Ciência e Agrotecnologia**, 42(3): 229-239, 2018.

DOWNES, F.P.; ITO, H. (ed.) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington: **American Public Health Association (APHA)** p. 676, 2001.

ETEBU, E.; NWAUZOMA. A. B. A Review On Sweet Orange (*Citrus Sinensis* L Osbeck): Health, Diseases And Management. **American Journal of Research Communication** 2, v. 2,p. 33-70.2014

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2018.

FERREIRA, A. B.,ALVARENGA, S. H. F., SÃO JOSÉ, J. F. B. Quality of organic fruits and vegetables sold in street markets. **Ver Inst Adolfo Lutz**, n.74, v 4, p.410-9, 2015.

FERREIRA, D. M. O. Extração de ágar de algas vermelhas do gênero *Gracilaria*.**Instituto Superior de Engenharia de Coimbra**, 2015.

FERREIRA, V.; WIEDMANN M.; TEIXEIRA, P.; STASIEWICZ J. *Listeria monocytogenes* Persistence in Food-Associated Environments: Epidemiology, Strain Characteristics, and Implications for Public Health. **Journal of Food Protection**, Vol. 77, No. 1, p. 150–170, 2014.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

GALINDO, M. V., **Filmes biodegradáveis de gelatina e quitosana com adição de óleos essenciais na conservação de presunto embalado a vácuo**. Universidade Tecnológica do Paraná, 2017.

GARCIA, L C. Aplicação de coberturas comestíveis em morangos minimamente processados. 2009. 121 p. **Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual**

de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/255140>. Acesso em: 12 jan. 2021.

GIAMPIERI, F.; TULIPAN, S.; ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; QUILES, J. L.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, n. 28, p. 9–19, 2012.

GIMÉNEZ, B., LACEY, A.L., PÉREZ-SANTÍN, E., LÓPEZ-CABALLERO, M.E., MONTERO, P. Release of active compounds from agar and agar e gelatin films with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, n. 30, p. 264-271, 2013.

HALTER, E. L., NEUHAUS, K., & SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemnatisulca* of a German freshwater pond. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63, p.641-647, 2013.

HYLDGAARD, M., MYGIND, T., Meyer, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology** 3(12); 2012.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p

JEYALTCHUMI, P., TUNUNG, R., MARGARET, S. P., SON, R., FARINAZLEEN, M. G., CHEAH, Y. K. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **International Food Research Journal** 17: 1-11, 2010.

KAVANAUGH, N. L., RIBBECK, K. Selected Antimicrobial Essential Oils Eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology** V. 78, p. 4057–4061, 2012.

LUKSIENE Z., PASKEVICIUTE, E. Novel approach to the microbial decontamination of strawberries: chlorophyllin-based photosensitization. **Journal of Applied Microbiology** 110, 1274–1283, 2011.

MARTINS, E. A.; *Listeria monocytogenes* em produtos fatiados do tipo *READY-TO-EAT*, presunto cozido esalame, comercializado no município de São Paulo: Ocorrência, Quantificação E Sorotipagem. **Tese de Doutorado. Faculdade de Saúde Pública**. São Paulo, 2009.

MIYAGUE, L., MAITO, C. D., MACEDO, R. E. F. LUCIANO, F. B. Combination off henolic acids and essential oils against *Listeria monocytogenes*. **School of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine**, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil, 2013.

ORNELAS-PAZ, J. J., YAHIA, E. M.; RAMÍREZ-BUSTAMANTE N.; PÉREZ-MARTÍNEZ J. D.; ESCALANTE-MINAKATA M. P.; IBARRA-JUNQUERA, V.; ACOSTA-MUÑIZ C.; GUERRERO-PRIETO, V.; OCHOA-REYES, E. Physical attributes and Chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria*

xananassa Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. **Food Chemistry** 138 p. 372–381, 2015.

PARREIDT, T. S., MULLER, K., SCHMID, M. Alginate-Based Edible Films and Coatings for Food Packaging Application. **Foods** 2018.

PINEAU, N.; CORDELLE, S.; SCHLICH, P. Temporal dominance of sensations: a new technique to record several sensory attributes simultaneously over time. In: **5TH PANGBORN SENSORY SCIENCE SYMPOSIUM, 2003**, Boston. Apresentação Boston: PANGBORN, 2003.

PRATES, M. F. O.; ASCHERI, D. P. R.; Efeito da Cobertura de Amido de Fruta-De-Lobo E Sorbitol E Do Tempo De Armazenamento Na Conservação Pós-Colheita De Frutos De Morango. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 29, n. 1, p. 21-32, jan./jun. 2011.

RAGHAV, P. K.; AGARWAL, N.; SAINI, M. Edible Coating Of Fruits And Vegetables: A Review. **International Journal of Scientific Research and Modern Education**. Vol 1, 2016.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria de Saúde. **Portaria 20 de 2017**. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação e de Procedimentos Operacionais Padronizados para a industrialização de frutas e vegetais minimamente processados e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de frutas e vegetais minimamente processados. Disponível em: <https://saude.rs.gov.br/upload/arquivos/carga20170437/13053734-1489756663-90-cevs.pdf> Acesso em 12 de setembro de 2020.

ROCHA, M.; ALEMÁN, A.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; MONTERO, M.P.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Atividade anti-hipertensiva de hidrolisados proteicos da castanha (*Umbrinacanosá*) incorporados em filmes de ágar após digestão gastrointestinal simulada. XXV **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos** – SBCTA, 2016.

ROWLANDS, R. E. G.; **Caracterização fenotípica e genotípica de *Listeria monocytogenes* isolada de produtos cárneos cruz comercializados no Município de São Paulo**. São Paulo, 2013.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 296 p.

SIQUEIRA, M. G. F. M. **Pesquisa de *Listeria ssp.* em áreas de processamento em estabelecimentos varejista de alimentos no estado do Pernambuco**, Brasil. 2013.

SHIGEMATSU, E. Coberturas comestíveis à base de alginato de sódio, quitosana e água de coco em cenouras (*Daucus carota* L.) minimamente processadas: Avaliação de potencial probiótico e efeitos sobre parâmetros físico-

químicos, microbiológicos e sensoriais. **Repositório Institucional Unesp**. São José do Ribirão Preto, 2017. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/150751> Acesso em: 03/01/2021.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. **Journal of Food Science**. Vol. 79, Nr. 7, 2014.

VÁZQUEZ-BOLAND, J.A., KUHN, M., BERCHE, P., CHAKRABORTY, T., DOMÍNGUEZ-BERNAL, G., WERNER GOEBEL, W., GONZÁLEZ-ZORN, B., WEHLAND, J., KREFT, J. Listeria Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 584–640 Vol. 14, No. 3, 2001. ZHANG, Y. YEH, E. HALL, G. CRIPE, J. BHAGWAT, A.A. MENG, J. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p. 47–53, 2007.

ZENGIN, G. H., BAYSAL, A. H. Antioxidant and antimicrobial activities of thyme and clove essential oils and application in minced beef. **Journal of Food Processing and Preservation**. V. 39, 1261–1271, 2014.

6 Relatório de Campo

Optou-se pelas coberturas de alginato de sódio e ágar-ágar. Para a avaliação específica contra *Listeria monocytogenes* optou-se por morangos com coberturas bioativas de alginato de sódio incorporados com óleo essencial de tomilho e/ou óleo essencial de laranja doce, pois após estudos preliminares foi constatado que esta foi a cobertura que apresentou os melhores resultados contra fungos e contras as demais bactérias.

Não foram realizadas as análises de *Listeria monocytogenes* nos tempos de 8 dias e de 15 dias em função do início da pandemia de COVID-19 que nos obrigou a adotar o isolamento e distanciamento social e interromper as atividades experimentais no laboratório.

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

7 Artigo

Desenvolvimento e caracterização do efeito da utilização de cobertura bioativa de alginato de sódio e ágar-ágar adicionada de óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e de laranja doce (*Citrus aurantium* var. *Dulcis*) com propriedades antimicrobianas aplicada sobre morangos.

1. Introdução

Nas últimas décadas vem-se observando uma maior preocupação dos indivíduos no que diz respeito à saúde e atenção com a longevidade. Em razão disso e de outros fatores, como alterações nos hábitos de vida da sociedade moderna, é que a cada vez se busca uma alimentação mais saudável, a exemplo do aumento do consumo de frutas em todo o mundo. As frutas prontas para consumo ou que exigem pouco ou nenhum preparo para serem consumidas com segurança, estão sendo cada vez mais demandadas, principalmente pela conveniência e praticidade que estes produtos oferecem, tanto na hora de comprar quanto na hora de consumir (ANTUNES *et al*, 2012; ALVES *et al*, 2011).

Paralelo a esse evento, o aumento de infecções por alimentos tem sido foco de preocupação no mundo todo, entre as organizações responsáveis pela saúde pública. A epidemiologia de doenças causadas por microrganismos presentes em alimentos tem mudado, em função de fatores como aumento da suscetibilidade da população, mudanças no comportamento alimentar e aparecimento de patógenos emergentes, que estão envolvidos na produção, processamento e distribuição de alimentos (GOMEZ-ALDAPA *et al*, 2017).

O morango é uma fruta muito tradicional que pode ser consumida *in natura* ou em diversas preparações, tais como caldas, iogurtes, bebidas, biscoitos e sorvetes, entre outras. Além de ter uma produção sazonal, é uma fruta muito delicada com alta taxa respiratória, sendo, por isso, altamente perecível (CASTRICINI *et al*, 2017). A comercialização de morangos a grandes distâncias é dificultada devido à sua elevada perecibilidade, decorrente principalmente da suscetibilidade ao desenvolvimento de agentes microbianos, inclusive patogênicos (CUNHA JUNIOR *et al*, 2012).

Conhecendo-se a ampla distribuição de *L. monocytogenes* na natureza, sua patogenicidade, capacidade de sobreviver mesmo em alimentos refrigerados e a importância em relação à saúde pública, torna-se necessário a elaboração de medidas eficazes no controle da contaminação por esse patógeno (SIQUEIRA, 2013).

Nesse sentido, a fim de minimizar contaminantes patógenos tem sido proposto a utilização de óleos essenciais com ação antimicrobiana, visando à inibição do crescimento desses microrganismos em alimentos. Estes compostos atuam na membrana plasmática, levando ao vazamento de substratos citoplasmáticos, resultando em morte celular, podendo ser um importante aliado na conservação de frutas (MIYAGUE *et al*, 2013).

Raros são os estudos onde os óleos essenciais são aplicados diretamente em alimentos, principalmente pela limitação sensorial de sua aplicação, os quais modificam significativamente o sabor e o aroma do produto. Desse modo, uma opção para a utilização direta seria a inclusão de óleos essenciais em filmes ou coberturas comestíveis bioativas, que permitissem a ação do óleo sem alterar significativamente as características sensoriais do produto (DANNENBERG *et al.*, 2017).

Uma tecnologia alternativa cada vez mais utilizada e avaliada como um procedimento viável para elevar o tempo de vida de frutas, é o emprego de coberturas comestíveis. Esses revestimentos têm por objetivo apresentar uma atuação funcional e coadjuvante, contribuindo para a preservação da textura e do valor nutricional, reduzindo as trocas gasosas superficiais e a perda ou ganho excessivo de água. Ao promover alterações na permeabilidade e, por conseguinte, alterar a atmosfera interna, essas coberturas têm sido indicadas, principalmente, para produtos com alta taxa de respiração (ASSIS; BRITTO, 2014).

Com o propósito de testar a potencialidade de coberturas bioativas a base de ágar-ágar e alginato, incorporadas com óleo essencial de tomilho e/ou óleo essencial de laranja doce, idealizou-se aplicá-las em morangos de forma a manter as características físico-químicas, inibir o desenvolvimento fúngico e bacteriano e avaliar o potencial antimicrobiano frente à *Listeria monocytogenes*.

Neste contexto este trabalho teve o objetivo de desenvolver e caracterizar o efeito da utilização de coberturas comestíveis bioativas a base de alginato de sódio ou ágar-ágar, adicionadas de óleo essencial de tomilho e/ou de laranja doce, e avaliar as propriedades antimicrobianas especialmente contra *Listeria monocytogenes* aplicadas sobre morangos.

2. Material e Métodos

2.1 Aquisição da amostra

Foram utilizados os óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e de laranja doce (*Citrus aurantium* var. *Dulcis*) da empresa Ferquima, Indústria e Comércio de Óleos Essenciais, acondicionados em frasco âmbar, lacrados, com volume de total de 100 mL. As frutas (morangos) de morangueiro (*Fragaria x Ananassa duchesne*) foram adquiridas em comércios varejistas da região de Pelotas-RS, Brasil. O óleo essencial de tomilho foi extraído com destilação a vapor das flores e folhas, e tem como seus principais componentes Timol= 50%, p-cimeno= 30%, γ -terpineno= 6% Linalol= 5% , Carvacrol= 5%, α -pineno= 2%, Mirceno= 2%. O óleo essencial de laranja doce teve como método de prensagem a frio da casca dos frutos, e tem como seus principais componentes d-imoneno = 96% α -pineno = 0,5% Mirceno = 1,8% Sabineno = 0,3%.

2.2 Preparação e aplicação de coberturas adicionadas de óleo essencial

Prepararam-se as soluções filmogênicas de ágar-ágar e alginato de sódio adicionadas de óleo essencial de tomilho e/ou óleo essencial de laranja doce. Estas soluções foram aplicadas por imersão em morangos. A solução filmogênica de ágar-ágar comestível foi elaborada em concordância com a metodologia proposta por Giménez *et al.* (2013) e Rocha *et al.* (2016), com algumas modificações. Os filmes foram preparados com 1,5g de ágar-ágar comestível em 100mL de água destilada sob agitação constante a 90°C durante 30 minutos. Após, adicionou-se o glicerol como plastificante (1%; g/100g de

ágar), sendo homogeneizado durante 20 minutos. Para a obtenção dos filmes incorporados com os óleos essenciais, adicionou-se 0,1g de óleo essencial, após o aquecimento da solução filmogênica (SF) de ágar a 40°C e homogeneização durante 5 minutos, posteriormente realizou-se secagem a 40°C durante 16 horas.

A solução filmogênica de alginato de sódio foi preparada em conformidade com a metodologia proposta por Shigemasu (2017) com concentração de alginato de sódio (1,5% m/v), óleo essencial de tomilho (1,5%); glicerol (0,75%) e Tween80 (0,05%).

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

As amostras de morango foram higienizada em solução clorada 200ppm por 15 minutos e após foram imersas nas respectivas soluções filmogênicas por 1 minuto, sofreram secagem por 60 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente, foram embaladas em PEBD (Polietileno de Baixa Densidade) e armazenadas em temperatura de refrigeração ($\leq 7^{\circ}\text{C}$) até a retirada das amostras.

As coberturas tiveram sua aplicação na forma de 9 tratamentos, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela1. Tratamentos aplicados a morangos com e sem coberturas comestíveis de ágar-ágar ou alginato de sódio, adicionadas de óleo essencial de tomilho e/ou laranja doce.

Tratamento	Descrição
T1	Morangos controle sem cobertura.
T2	Morangos com cobertura de alginato de sódio.
T3	Morangos com cobertura de alginato de sódio e óleo essencial de tomilho.
T4	Morangos com cobertura de alginato sódio e óleo essencial de laranja doce.
T5	Morangos com coberturas de alginato de sódio e óleo essencial de tomilho e laranja doce.
T6	Morangos com cobertura de ágar-ágar.
T7	Morangos com cobertura de ágar-ágar e óleo essencial de tomilho.
T8	Morangos com cobertura de ágar-ágar e óleo essencial de laranja doce.
T9	Morangos com coberturas de ágar-ágar e óleo essencial de tomilho e laranja doce.

2.3 Avaliações dos morangos com soluções filmogênicas adicionadas de óleo essencial

Os produtos depois de elaborados de acordo com os tratamentos foram armazenados por até 15 dias a temperatura $\leq 7^{\circ}\text{C}$. A partir de cada um dos produtos foi retirada uma amostra de 25 g em três tempos: 24h, oito e quinze dias após a elaboração do produto. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.3.1 Avaliações físico-químicas dos morangos com soluções filmogênicas adicionadas de óleo essencial

As análises físico-químicas nas amostras de morango revestidas de com biofilme foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Adolfo Lutz (2008).

pH

Pesaram-se 10g da amostra em um béquer e diluído com 100mL de água. Após agitação, a determinação do pH foi realizada por meio do aparelho pHmetro.

Acidez Titulável

Foram pesados de 1 a 5g da amostra, transferido para um frasco *Erlenmeyer* de 125mL com o auxílio de 50mL de água. Adicionaram-se de 2 a 4 gotas da solução fenolftaleína, titulando-se a amostra com solução de hidróxido de sódio 0,1M, até coloração rósea.

Perda de massa

A massa das amostras teve sua determinação por meio de pesagem diária, em balança eletrônica com precisão de 0,001g. A perda de massa foi calculada por meio da Equação:

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

Sólidos solúveis

Transferiram-se de 3 a 4 gotas da amostra homogeneizada para o prisma do refratômetro. Promoveu-se a circulação de água à temperatura constante pelo equipamento a 20°C. Após um minuto, procedeu-se a leitura diretamente na escala dos graus Brix.

2.3.2 Avaliações microbiológicas dos morangos com soluções filmogênicas adicionadas de óleo essencial

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

Contagem de bolores e leveduras

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

Contagem de bactérias aeróbias mesófilas

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

Contagem de bactérias psicotróficas

Para a contagem de bactérias psicotróficas utilizou-se semeadura em Ágar Para Contagem Total (*Plate Count Agar-PCA*) com incubação a 7°C por 10 dias.

Enumeração de coliformes totais e termotolerantes

Os coliformes totais e termotolerantes foram enumerados através da técnica do Número Mais Provável (NMP). A análise presuntiva de coliformes foi realizada em Caldo Lauril Sulfato de Sódio (LST), com incubação por 48 horas a 35°C. Coliformes totais foram enumerados em Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante, com incubação a 35°C por 48 horas. A quantificação de coliformes termotolerantes foi realizada em Caldo *Escherichia coli*, (EC) com incubação a 45,5°C por 24 horas.

2.3.3 Avaliações do potencial antimicrobiano frente à *Listeria monocytogenes*

Morangos sem cobertura (controle) e com adição de cobertura preparada com óleo essencial de Tomilho e de Laranja doce foram submetidos avaliação da atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*. As amostras sofreram contaminação experimental pelo agente, às quais foram adicionados separadamente inóculos de 1ml (padronizados na concentração D.O 0,5 na escala de McFarland que equivale $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹) de *Listeria*

monocytogenes (ATCC 7644). Os produtos, após elaboração de acordo com os tratamentos listados a seguir, foram armazenados por até 24 horas à ≤ 7 °C. A partir de cada um dos produtos foi extraída uma amostra de 25 g submetida à avaliação da presença de *Listeria monocytogenes* no tempo de 24h.

Para correta avaliação foram realizados os seguintes tratamentos descritos na Tabela 2.

Tabela 2 Tratamentos aplicados a morangos com e sem coberturas comestíveis de alginato de sódio, adicionadas de óleo essencial de tomilho e/ou laranja doce para avaliação do efeito anti-*Listeria monocytogenes*.

Tratamento	Descrição
T1	Morangos preparados sem cobertura e sem óleo essencial (grupo controle)
T2	Morango com cobertura de alginato e óleo essencial de tomilho + óleo essencial de laranja doce
T3	Morango sem cobertura contaminado com <i>Listeria monocytogenes</i> .
T4	Morango contaminado com <i>Listeria monocytogenes</i> com cobertura de alginato óleo essencial de tomilho + óleo essencial de laranja doce
T5	Morango com cobertura de alginato e óleo essencial de tomilho + óleo essencial de laranja doce, contaminado com <i>Listeria monocytogenes</i> .

2.3.4 Avaliação sensorial dos morangos com soluções filmogênicas adicionadas de óleo essencial

A análise sensorial foi realizada após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pelotas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética (5317 – UFPEL) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas sob o número CAEE 30622820.8.0000.5317. O método utilizado foi o Teste de Associação Implícita (TAI), que tem como objetivo ações e conceitos. O TAI mensura a força associativa gerada automaticamente a partir de dois conceitos. Tem como fundamentação a premissa de que o tempo de resposta do indivíduo a determinados estímulos é capaz de demonstrar o grau de associação entre os conceitos apresentados (GREENWALD *et al*, 1998). No

entanto, foi necessário ajustar o teste TAI, identificando técnicas que se aplicassem ao objetivo de avaliação sensorial e que pudesse ser aplicado a distância.

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

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

A análise estatística deu-se através de ANOVA e o teste de comparação de médias foi através do teste Benferroni a 5% de probabilidade.

2.3.5 Análise estatística

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

3. Resultados e Discussão

3.1 Análises Físico-Químicas

As Tabela 3 e 4 mostradas a seguir possibilitam a visualização dos resultados das análises físico-químicas realizadas em morangos com e sem cobertura de alginato de sódio ou de ágar-ágar, adicionadas ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C.

Tabela 3 Análises físico-químicas realizadas em morangos com e sem cobertura de alginato de sódio, adicionada ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C

Tratamento	pH			Acidez (%)			Perda de massa (%)			Sólidos solúveis (°brix)		
	Tempo 0	Tempo 8	Tempo 15	Tempo 0	Tempo 8	Tempo 15	Tempo 0	Tempo 8	Tempo 15	Tempo 0	Tempo 18	Tempo 15
T1	7,30 ^{aA}	5,90 ^{aB}	3,60 ^{aC}	34,28 ^{aA}	12,00 ^{aB}	7,30 ^{aC}	18,90 ^{aA}	14,75 ^{aB}	8,04 ^{aC}	6,20 ^{aA}	6,20 ^{abA}	2,40 ^{aB}
T2	3,26 ^{bA}	3,69 ^{bA}	3,87 ^{aA}	15,09 ^{bA}	10,28 ^{abB}	1,21 ^{bC}	14,11 ^{bA}	6,88 ^{bcB}	2,30 ^{bC}	6,60 ^{aA}	8,30 ^{aA}	0,40 ^{aB}
T3	3,14 ^{bA}	4,50 ^{abB}	3,65 ^{aA}	16,64 ^{bA}	8,22 ^{bB}	5,51 ^{cC}	11,90 ^{bcA}	7,76 ^{bB}	1,99 ^{bcC}	5,60 ^{aA}	5,80 ^{bA}	2,00 ^{aB}
T4	3,36 ^{bA}	5,80 ^{aB}	3,80 ^{aA}	27,27 ^{cA}	14,01 ^{cB}	4,07 ^{cC}	10,24 ^{cA}	7,34 ^{bB}	3,55 ^{bC}	5,50 ^{aA}	6,50 ^{abA}	9,40 ^{bB}
T5	3,06 ^{bA}	4,50 ^{abB}	3,65 ^{aA}	32,00 ^{aA}	8,22 ^{bB}	1,25 ^{bC}	12,83 ^{bcA}	5,69 ^{cB}	1,32 ^{cC}	5,50 ^{aA}	5,80 ^{bA}	4,00 ^{cA}

T1- Morango controle, T2 – Morango com cobertura de alginato, T3 – Morango com cobertura de alginato e óleo essencial de tomilho, T4 – Morango com cobertura de alginato e óleo essencial de laranja doce, T5- morango com cobertura de alginato e óleo essencial de tomilho e de laranja doce. Tempo 0 – até 24 horas de armazenamento, Tempo 8 - armazenamento de 8 dias e Tempo 15 - armazenamento de 15 dias. Letras minúsculas diferentes entre as linhas e indicam diferenças significativas entre os tratamentos aplicados ($p < 0,05$) e letras maiúsculas diferentes entre colunas indicam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento aplicados ($p < 0,05$).

Tabela 4 Análises físico-químicas realizadas em morangos com e sem cobertura de ágar-ágar, adicionada ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C

Tratamento	pH			Acidez			Perda de massa			Sólidos solúveis		
	Tempo	Tempo	Tempo	Tempo	Tempo	Tempo	Tempo	Tempo	Tempo	Tempo	Tempo	Tempo
	0	8	15	0	8	15	0	8	15	0	8	15
T1	3,50 ^{aA}	9,80 ^{aB}	7,30 ^{aB}	15,69 ^{aA}	15,42 ^{aA}	0,92 ^{aB}	8,90 ^{aA}	7,70 ^{aA}	5,90 ^{aA}	6,00 ^{aA}	3,90 ^{aB}	1,30 ^{aC}
T2	3,27 ^{aA}	8,30 ^{aB}	8,70 ^{aB}	5,84 ^{bA}	20,33 ^{bB}	6,66 ^{bA}	13,30 ^{bcA}	7,90 ^{aB}	5,60 ^{aC}	6,10 ^{aA}	9,20 ^{bB}	5,80 ^{bA}
T3	3,30 ^{aA}	3,40 ^{bA}	5,10 ^{bB}	8,07 ^{bAB}	10,00 ^{cA}	6,84 ^{bB}	11,60 ^{bA}	6,50 ^{aB}	3,70 ^{bC}	5,80 ^{aA}	2,10 ^{cB}	2,20 ^{cB}
T4	3,29 ^{aA}	2,50 ^{bA}	12,20 ^{cB}	6,68 ^{bA}	19,63 ^{bB}	1,82 ^{aC}	8,80 ^{aA}	4,10 ^{bB}	2,50 ^{bC}	6,20 ^{aA}	4,30 ^{aA}	1,80 ^{acB}
T5	3,21 ^{aA}	3,30 ^{bA}	3,40 ^{bA}	7,39 ^{bA}	10,10 ^{cB}	16,52 ^{cC}	14,60 ^{cA}	7,60 ^{aB}	6,20 ^{aB}	5,80 ^{aA}	4,10 ^{aAB}	3,10 ^{dB}

T1- Morango controle, T2 – Morango com cobertura de alginato, T3 – Morango com cobertura de alginato e óleo essencial de tomilho, T4 – Morango com cobertura de alginato e óleo essencial de laranja doce, T5- morango com cobertura de alginato e óleo essencial de tomilho e de laranja doce. Tempo 0 – até 24 horas de armazenamento, Tempo 8 - armazenamento de 8 dias e Tempo 15 - armazenamento de 15 dias. Letras minúsculas diferentes entre as linhas e indicam diferenças significativas entre os tratamentos aplicados ($p < 0,05$) e letras maiúsculas diferentes entre colunas indicam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento aplicados ($p < 0,05$).

3.1.1 Cobertura de Alginato de Sódio

pH

Nos tratamentos com cobertura de alginato de sódio verificou-se que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos tempos de armazenamento onde o tempo de 8 dias (T8) foi superior aos demais (T0 e T15). Os valores referentes ao pH estão diretamente ligados à senescência dos frutos.

A elevação no pH no decorrer do tempo foi explicada por Calegari et al. (2002) como uma consequência da diminuição da presença de ácidos orgânicos no morango, fato natural do seu processo de amadurecimento. Esses ácidos são utilizados na respiração e, por esse motivo, acarretam uma elevação do pH, mesmo em temperaturas de refrigeração. No entanto, é possível perceber que no tempo de armazenamento referente há 8 dias o pH sofreu alteração significativa na maioria das amostras, excetuando a que recebeu tratamento à base de cobertura de alginato e óleo essencial de tomilho. Observa-se que todos os valores de pH encontrados após 15 dias de armazenamento sob temperatura de 7°C mostraram-se superiores aos registrados no dia inicial, mas as menores alterações ocorreram nas amostras com óleo essencial de laranja e na contendo óleos essenciais de laranja e de tomilho.

Acidez Titulável

Na análise de acidez houve diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação aos tempos de armazenamento onde foi observado que o T0 foi superior aos tempos de armazenamento de 8 dias (T8) e de 15 dias (T15). Em seu estudo Martínéz (2018) encontrou resultados semelhantes ao estudar o efeito dos revestimentos em morangos incorporados a diferentes concentrações de óleo essencial de orégano em até 15 dias de armazenamento, onde os valores de acidez foram diminuindo ao longo dos tempos de armazenamento e relacionou ao aumento do pH e conversão dos açúcares como resultado das reações enzimáticas ligadas ao amadurecimento dos frutos. Moraes et al (2008) também encontrou estes resultados ao analisar a qualidade de morangos processados minimamente mantidos sob refrigeração e atmosfera controlada, onde observou a diminuição dos valores de acidez ao longo do período de armazenamento, pois

os ácidos orgânicos tendem a diminuir durante o amadurecimento, em virtude de sua utilização como substrato para a respiração.

Perda de massa

Verificou-se que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores de perda de massa em relação aos tratamentos aplicados e aos tempos de armazenamento. O tratamento controle (T0) apresentou o valor de perda de massa significativamente superior ($p < 0,05$) ao morango com cobertura de alginato de sódio e óleo essencial de tomilho (T3) e ao morango com cobertura de alginato de sódio e óleo de laranja doce e óleo de tomilho (T5). No primeiro dia (T0) foram encontrados os maiores valores de perda de massa, sendo significativamente superior ($p < 0,05$) aos valores do oitavo (T8) e do décimo quinto dia (T15). E no oitavo (T8) dia foram encontrados valores de perda de massa significativamente superior ($p < 0,05$) aos valores de perda de massa do décimo quinto dia (T15).

Segundo Hajji et al (2018) a perda de massa é fator indicativo do frescor da fruta e sua ocorrência deve-se à perda de água pela transpiração, bem como pela diminuição das reservas de carbono resultantes do processo de respiração. A perda máxima de massa admitida, de acordo com Ronque (1998), para a comercialização do morango é de 6% da massa da fruta na colheita, não devendo superar este índice para sua aceitação. Já Nunes et al (1995), considera aceitável a faixa que vai de 6 a 10% de perda de massa do morango.

Sólidos Solúveis

Nos tratamentos com cobertura de alginato de sódio houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores de Sólidos Solúveis em relação aos tratamentos aplicados e a amostra sem cobertura e o tempo de armazenamento referente a 15 dias diferiu significativamente dos demais tempos. Em seu estudo, Mendonça (2016) ao analisar morangos cobertos com diferentes filmes biodegradáveis em 19 dias de armazenamento encontrou resultados semelhantes ao verificar que suas coberturas tiveram influência sobre os morangos quando relacionadas a sólidos solúveis.

3.1.2 Cobertura de Ágar-Ágar

pH

Em relação às coberturas de ágar-ágar (Tabela 4) verificou-se que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores de pH em relação aos tratamentos aplicados no tempo zero, porém, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos tratamentos nos tempos 8 e 15. E também houveram diferenças significativas em relação aos tempos de armazenamento. O pH do tempo de armazenamento de 15 dias (T15) foi significativamente superior ao tempo de armazenamento de até 24 horas (T0), e assim como observado nas amostras com cobertura de alginato, os valores de pH encontrados após 15 dias de armazenamento sob temperatura de 7°C mostraram-se superiores aos registrados no dia inicial, repetindo-se a ocorrência de menor índice de alterações ocorreram nas amostras com óleo essencial de laranja (T4) e na contendo óleos essenciais de laranja e de tomilho (T5).

Em seu estudo Oliveira (2016), ao analisar coberturas comestíveis de quitosana adicionada de óleo essencial de *Sálvia esclareia* na conservação de morangos, também não encontrou diferenças significativas para análise de pH relacionando aos tratamentos, mas os valores tiveram alteração ao longo do tempo de armazenamento, onde o aumento do pH se dá pelo metabolismo de maturação dos morangos.

Acidez Titulável

Em relação à acidez, verificou-se que houve diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação aos tratamentos aplicados e ao tempo de armazenamento, o que se diferencia do estudo de Peano et al (2014) ao elaborar diferentes materiais de embalagem para manutenção da vida útil de morangos observaram que em relação os valores de acidez não obtiveram diferenças entre os diversos tratamentos e nem em relação ao tempo de armazenamento. Já no estudo de Silva (2019) ao elaborar revestimentos à base de pectina de maçã, nanocristais de celulose e óleo essencial de capim-limão observou que os valores de acidez diminuiram com o tempo de armazenamento independente do revestimento utilizado, a redução pode ser esperada como resultado de mudanças metabólicas no processo respiratório.

Perda de massa

Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores de perda de massa em relação aos tratamentos aplicados e aos tempos de armazenamento. Em relação aos tratamentos, o morango controle (T1) apresentou o valor de perda de massa significativamente inferior ($p < 0,05$) aos demais tratamentos. Isto demonstra que as coberturas de ágar-ágar com ou sem óleos essenciais não foram boas barreiras para minimizar a perda de massa, diferentemente das coberturas de alginato, que diminuíram a perda de massa.

Ao contrário de Khan (2019) em seu estudo sobre revestimento comestível à base de quitosana observou que ao longo dos dias de armazenamento todas as amostras aumentaram o % de perda de massa, sendo maior na amostra controle, podendo dizer que as amostras revestidas tiveram efeito sobre a perda de massa. Em relação ao tempo de armazenamento, houve diferenças significativas entre todos os tempos, no primeiro dia (T0) foram encontrados valores de perda de massa significativamente superior ($p < 0,05$) aos valores de perda de massa do oitavo (T8) e do décimo quinto dia (T15). E no oitavo (T8) dia foram encontrados valores de perda de massa significativamente superior ($p < 0,05$) aos valores de perda de massa do décimo quinto dia (T15).

Sólidos Solúveis

Por último, em relação aos sólidos solúveis verificou-se que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores de sólidos solúveis em relação aos tratamentos aplicados e aos tempos de armazenamento. Os morangos com cobertura de ágar-ágar (T2) e com cobertura de ágar-ágar e óleo essencial de tomilho (T3) apresentaram valores de sólidos solúveis significativamente superior ($p < 0,05$) aos demais tratamentos, fato que, de certa forma contraria os resultados obtidos por Campos *et al* que não percebeu variações significativas nos SST (°Brix) tanto com relação ao período de tempo do estudo como entre os tratamentos aplicados.

Por outro lado, resultados de Gomes *et al* (2007), indicam que para a banana pacovan foram encontradas variações em ° Brix, de 1,77 no primeiro dia

e 13,24, no oitavo, enquanto que nos frutos que receberam banho óleo essencial verificou-se para 26,46 após oito dias. Vieites *et al* (2006), explica a variação no teor de sólidos solúveis nos diferentes tratamentos por tratar-se de frutos não climatéricos. Segundo os autores, no caso de frutos climatéricos o menor grau de acidez durante a armazenagem está relacionado especialmente com o processo respiratório e a conversão dos ácidos em açúcares no qual caracteriza o seu amadurecimento. Neste experimento a diminuição no teor de acidez titulável nos morangos deve-se provavelmente, a sua utilização na conversão de açúcares. Fato este verificado pela maior variação no teor de sólidos solúveis encontrados. No que diz respeito ao tempo de armazenamento, no tempo 15 dias foram encontrados valores de sólidos solúveis significativamente inferiores ($p < 0,05$) aos valores de sólidos solúveis do primeiro dia, o que é corroborado por Gil-Geraldo *et al* (2018).

3.2 Análises Microbiológicas

As Tabela 5 e 6 mostradas a seguir possibilitam a visualização dos resultados das médias das contagens realizadas nas análises microbiológicas dos em morangos com e sem cobertura de alginato de sódio ou de ágar-ágar, adicionadas ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C.

Tabela 5 Análises microbiológicas realizadas em morangos com e sem cobertura de alginato de sódio, adicionada ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C

Tratamento	Bolors e Leveduras (UFC. g ⁻¹)			Mesófilos Aeróbios (UFC. g ⁻¹)			Psicrotróficos Aeróbios (UFC. g ⁻¹)		
	Tempo 0	Tempo 8	Tempo 15	Tempo 0	Tempo 8	Tempo 15	Tempo 0	Tempo 8	Tempo 15
T1	1,2x10 ^{4aA}	2,5x10 ^{4aA}	3,0x10 ^{4aA}	4,3x10 ^{3aA}	1,4x10 ^{4aB}	3,0x10 ^{3aA}	1,1x10 ^{5aA}	9,0x10 ^{6aB}	6,1x10 ^{6aB}
T2	1,9x10 ^{3bA}	1,4x10 ^{4aB}	1,7x10 ^{5bC}	8,8x10 ^{3aA}	2,2x10 ^{3bA}	1,7x10 ^{5bB}	1,1x10 ^{5aA}	1,6x10 ^{4bB}	1,7x10 ^{6aC}
T3	0 ^{cA}	1,5x10 ^{3bB}	4,5x10 ^{3cB}	3,3x10 ^{1bA}	3,3x10 ^{1cA}	4,5x10 ^{3aB}	2,6x10 ^{4bA}	1,7x10 ^{3cB}	7,0x10 ^{3bB}
T4	6,7x10 ^{3bA}	1,3x10 ^{5cB}	1,6x10 ^{3cA}	1,1x10 ^{3aA}	3,1x10 ^{3bA}	1,6x10 ^{3aA}	3,7x10 ^{4bA}	2,3x10 ^{6aB}	6,3x10 ^{3bC}
T5	1,1x10 ^{3bA}	3,3x10 ^{3bA}	6,5x10 ^{3cA}	1,0x10 ^{2cA}	3,3x10 ^{3bB}	6,5x10 ^{3aB}	2,0x10 ^{2cA}	1,9x10 ^{3cB}	1,2x10 ^{4cC}

T1- Morango controle, T2 – Morango com cobertura de alginato, T3 – Morango com cobertura de alginato e óleo essencial de tomilho, T4 – Morango com cobertura de alginato e óleo essencial de laranja doce, T5- morango com cobertura de alginato e óleo essencial de tomilho e de laranja doce. Tempo 0 – até 24 horas de armazenamento, Tempo 8 - armazenamento de 8 dias e Tempo 15 - armazenamento de 15 dias. Letras minúsculas diferentes entre as linhas e indicam diferenças significativas entre os tratamentos aplicados ($p < 0,05$) e letras maiúsculas diferentes entre colunas indicam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento aplicados ($p < 0,05$). Para realização da análise estatística os valores foram logaritmizados.

Tabela 6 Análises microbiológicas realizadas em morangos com e sem cobertura de ágar-ágar, adicionada ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C

Tratament o	Bolors e Leveduras (UFC. g ⁻¹)			Mesófilos Aeróbios (UFC. g ⁻¹)			Psicrotróficos Aeróbios (UFC. g ⁻¹)		
	Tempo 0	Tempo 8	Tempo 15	Tempo 0	Tempo 8	Tempo 15	Tempo 0	Tempo 8	Tempo 15
T1	1,4x10 ^{4aA}	8,8x10 ^{6aB}	2,1x10 ^{6aB}	1,9x10 ^{4aA}	1,8x10 ^{3aB}	1,3x10 ^{5aC}	3,3x10 ^{4aA}	2,6x10 ^{5aB}	4,1x10 ^{6aC}
T2	5,9x10 ^{4aA}	1,6x10 ^{7bB}	9,0x10 ^{6aC}	6,8x10 ^{4aA}	1,0x10 ^{5bB}	3,8x10 ^{5aB}	7,4x10 ^{4aA}	1,6x10 ^{7bB}	1,2x10 ^{6aC}
T3	0 ^{bA}	6,0x10 ^{1cB}	2,4x10 ^{4bC}	3,6x10 ^{2bA}	2,2x10 ^{3aB}	7,6x10 ^{3bB}	1,5x10 ^{3bA}	2,3x10 ^{2cB}	3,3x10 ^{4bC}
T4	7,8x10 ^{3cA}	2,0x10 ^{2dB}	6,9x10 ^{6aC}	6,0x10 ^{3cA}	7,5x10 ^{5bB}	3,0x10 ^{6cC}	6,0x10 ^{3bA}	1,3x10 ^{6dB}	5,5x10 ^{6aB}
T5	2,6x10 ^{2dA}	4,6x10 ^{4eB}	2,5x10 ^{6aC}	4,3x10 ^{2bA}	5,2x10 ^{3aB}	1,5x10 ^{3bB}	2,0x10 ^{2cA}	1,2x10 ^{5aB}	3,4x10 ^{6aC}

T1- Morango controle, T2 – Morango com cobertura de alginato, T3 – Morango com cobertura de alginato e óleo essencial de tomilho, T4 – Morango com cobertura de alginato e óleo essencial de laranja doce, T5- morango com cobertura de alginato e óleo essencial de tomilho e de laranja doce. Tempo 0 – até 24 horas de armazenamento, Tempo 8 - armazenamento de 8 dias e Tempo 15 - armazenamento de 15 dias. Letras minúsculas diferentes entre as linhas e indicam diferenças significativas entre os tratamentos aplicados ($p < 0,05$) e letras maiúsculas diferentes entre colunas indicam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento aplicados ($p < 0,05$). Para realização da análise estatística os valores foram logaritmizados.

3.2.1 Cobertura de Alginato de Sódio

Contagem de bolores e leveduras

Em relação aos bolores e leveduras (Tabela 5) verificou-se que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores das enumerações em relação aos tratamentos aplicados, e em relação aos tempos de armazenamento. Os morangos com cobertura de alginato e óleo essencial de tomilho (T3) apresentaram os menores valores de enumeração de fungos, sendo significativamente inferior ($p < 0,05$) aos outros tratamentos, com exceção do morango com cobertura de alginato e óleo de laranja doce e óleo de tomilho (T5) do qual não se diferenciou significativamente.

O efeito antimicrobiano pode ser associado ao óleo essencial de tomilho, em razão da diferença de resultados demonstrados nas amostras. Este resultado pode ser explicado pelo considerável potencial antimicrobiano do timol e do carvacrol, que são os principais constituintes do óleo de tomilho (ROCHA *et al.*, 2012; Pozzo *et al.*, 2011).

Microrganismos Mesófilos Aeróbios

No caso dos microrganismos Mesófilos aeróbios (Tabela 5) verificou-se que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores das enumerações em relação aos tratamentos aplicados e em relação aos tempos de armazenamento. Os morangos com cobertura de alginato e óleo essencial de tomilho (T3) apresentaram os menores valores de enumeração de microrganismos mesófilos aeróbios, sendo significativamente inferior ($p < 0,05$) aos tratamentos morango controle (T1) e morango com cobertura de alginato (T2).

A presença de óleos essenciais na cobertura de alginato atuaram de forma significativa para inibição microbiana. Nessas análises o resultado obtido nas amostras com óleo essencial de laranja doce também demonstrou uma atividade antimicrobiana, porém mais fraca que a do óleo essencial de tomilho, ainda que ambos tenham demonstrado ação significativa na redução de microrganismos mesófilos aeróbios das amostras.

Em estudo realizado por Everton *et al* (2020), demonstraram uma eficiente ação antimicrobiana do óleo essencial de Laranja doce, tanto para bactérias Gram positivas como para Gram negativas. No entanto, Eldah-shane e Halim (2016), chamam atenção para o fato de que a atividade antibacteriana do óleo provém da presença de compostos oxigenados na sua constituição, o que lhe concede potencialidade para aplicação na conservação de alimentos.

Microrganismos Psicotróficos Aeróbios

Verificou-se que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores das enumerações de microrganismos psicotróficos (Tabela 5) em relação aos tratamentos aplicados, e em relação aos tempos de armazenamento. Os morangos com cobertura de alginato de sódio e óleo essencial de tomilho (T3) e os morangos com cobertura de alginato e óleo de laranja doce e óleo de tomilho (T5) apresentaram os menores valores de enumeração de microrganismos psicotróficos, sendo significativamente inferior ($p < 0,05$) ao tratamento controle (T1), porém, dos demais tratamentos não diferiram significativamente. As médias das contagens são demonstradas na Tabela 5.

Estes resultados indicam que as coberturas de alginato de sódio adicionadas de óleo essencial de tomilho e óleo essencial de laranja doce apresentam-se como inibitórias a microrganismos psicotróficos e este efeito pode ser atribuído aos constituintes desses óleos, especialmente, segundo Calo *et al* (2015) em decorrência da ação do citruleno e o limoneno, considerados predominantes nos óleos essenciais cítricos e do timol e do carvacrol predominantes no óleo de tomilho.

Coliformes totais e termotolerantes

Quanto a enumeração de coliformes totais e termotolerantes realizadas em morangos com e sem cobertura de alginato, adicionadas ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C, observou-se que não houve crescimento nas amostras

apresentadas, não podendo analisar as diferenças em relação aos tratamentos aplicados e seus tempos de armazenamento. Os resultados podem ser atribuídos à etapa de higienização dos morangos que antecede os revestimentos. Em seu estudo Guimarães (2013) ao estudar a produtividade, qualidade e conservação pós colheita de frutos em diferentes cultivares de morangos encontrou resultados semelhantes ao não detectar a presença de coliformes totais em níveis significativos nos frutos de nenhuma das cultivares de morangueiro, justificando o emprego de boas práticas agrícolas.

3.2.2 Cobertura de Ágar-Ágar

Contagem de Bolores e Leveduras

Pela análise dos dados obtidos (Tabela 6) verificou-se que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores das enumerações de fungos em relação aos tratamentos aplicados, e em relação aos tempos de armazenamento.

Em relação aos tratamentos, os morangos com cobertura de ágar-ágar e óleo essencial de tomilho (T3) apresentaram os menores valores de enumeração de bolores e leveduras, sendo significativamente inferior ($p < 0,05$) aos outros tratamentos, com exceção do morango com cobertura de ágar-ágar e óleo de laranja doce e óleo de tomilho (T5) morango do qual não se diferenciou significativamente. No estudo de Martínéz (2018) ao avaliar o efeito de revestimentos à base de quitosana com adição de óleo essencial de tomilho (*Thymus capitatus*) para testar a vida útil de morangos pode observar que a adição do óleo essencial aos revestimentos produziu barreiras contra umidade, taxa de respiração, produção de etileno provocando um atraso no amadurecimento dos frutos.

Microrganismos Mesófilos Aeróbios

Foram identificadas, por meio da análise dos dados, que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores das enumerações de microrganismos mesófilos aeróbios em relação aos tratamentos aplicados e aos tempos de armazenamento (Tabela 6).

Em relação aos tratamentos, os morangos com cobertura de ágar-ágar e óleo essencial de tomilho (T3) e os morangos com cobertura de ágar-ágar e óleo de laranja doce e óleo de tomilho (T5) foram os que apresentaram os menores valores de enumeração de microrganismos mesófilos aeróbios, sendo significativamente inferiores ($p < 0,05$) aos demais tratamentos. E em relação ao tempo de armazenamento, no tempo de até um dia (T0) foram encontrados os menores valores de contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, sendo significativamente inferiores ($p < 0,05$) aos valores de microrganismos mesófilos aeróbios do tempo de 15 dias. O tempo de até um dia (T0) não diferiu do tempo de oito dias (T8) em relação à contagem de microrganismos mesófilos aeróbios.

Everton et al (2020) ao estudar a atividade antimicrobiana óleo essencial de *Citrus sinensis* pode comprovar sua atividade antimicrobiana devido ao seu principal componente d-limonene ser eficiente ao inibir a bactéria *Staphylococcus aureus* pelo Método de Difusão de Disco, juntamente com os componentes do óleo essencial de tomilho formam boas barreiras contra microrganismos.

Microrganismos Psicotróficos Aeróbios

Verificou-se que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores das enumerações de microrganismos psicotróficos em relação aos tratamentos aplicados e aos tempos de armazenamento (Tabela 6). Em relação aos tratamentos, os morangos com cobertura de ágar-ágar e óleo essencial de tomilho (T3) apresentaram os menores valores de enumeração de microrganismos psicotróficos, sendo significativamente inferiores ($p < 0,05$) aos demais tratamentos, com exceção dos morangos com cobertura de ágar-ágar e óleo de laranja doce e óleo de tomilho (T5) do qual não diferiu significativamente.

Os componentes presentes no óleo essencial de tomilho podem explicar os resultados encontrados. Em seu estudo Solomakos et al (2007) para avaliar os efeitos do óleo essencial de tomilho em diferentes concentrações contra *E. coli*, encontrou que devido aos componentes carvacrol e timol nas concentrações 0,5% 1,0% 1,5% e 2,0% tiveram ação antimicrobiana contra a bactéria. Em relação ao tempo de armazenamento, no tempo de até um dia (T0) foram encontrados os menores valores de contagem de microrganismos psicotróficos,

sendo significativamente inferiores ($p < 0,05$) aos valores de microrganismos psicrotróficos dos tempos de 8 e de 15 dias.

Coliformes totais e termotolerantes

Quando a enumeração de coliformes totais e termotolerantes realizadas em morangos com e sem cobertura de ágar-ágar, adicionada ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho, em três tempos de armazenamento sob temperatura de 7°C, não houve crescimento perceptível nas amostras não sendo possível avaliar as diferenças em relação aos tratamentos e/ou tempos de armazenamento. Em seu estudo Kempka et al (2012) encontrou resultados semelhantes ao avaliar o desenvolvimento de cobertura à base de colágeno parcialmente hidrolisado, manitol e antimicrobianos aplicados em morangos, onde também não houve crescimento nas amostras em 1 dia de armazenamento.

Segundo Instrução normativa (IN) nº 60 de 2019, que estabelece padrões microbiológicos de alimentos para frutas preparadas (inteiras, descascadas ou fracionadas), sanificadas, refrigeradas ou congeladas mostra que para *Escherichia coli*/g é permitido 2×10^6 /g.

Listeria monocytogenes

A Tabela 7 mostrada a seguir possibilita a visualização dos resultados da pesquisa de *Listeria monocytogenes* realizada em morangos com e sem cobertura de alginato, adicionada ou não de óleos essenciais de laranja doce e de tomilho.

Tabela 7 *Listeria monocytogenes* em morangos com e sem cobertura de alginato adicionada de ambos os óleos essenciais, ou seja, de laranja doce e de tomilho, em triplicata sob temperatura de 7°C.

Tratamento	<i>Listeria monocytogenes</i>
M1	Ausência
M2	Ausência
M3	Presença
M4	Ausência
M5	Presença

M1– Morango controle; M2 – Morango somente com cobertura de alginato; M3 – Morango sem cobertura e contaminado com *Listeria monocytogenes*; M4 – Morango contaminado com *Listeria monocytogenes* e depois imerso na cobertura de alginato; M5 – Morango com cobertura de alginato e depois contaminado de *Listeria monocytogenes*.

Conforme demonstrado a cobertura de alginato aplicada a previamente à contaminação (M5) não teve ação contra o microrganismo, sendo este detectado em análise efetuada após o tratamento. Em contrapartida, a imersão em cobertura de alginato com a combinação de óleos essenciais de tomilho e laranja doce (M4) feita posteriormente à contaminação dos frutos pelo agente apresentou ação antimicrobiana, tendo em vista a ausência de *Listeria monocytogenes* na amostra analisada.

Em estudo Miyague (2015) ao testar combinações de ácidos fenólicos e óleos essenciais contra *Listeria monocytogenes* em tubos com caldo BHI pode observar que a combinação do ácido fenólico Isotiocianato de alila e o óleo essencial carvacrol foram as combinações mais eficazes contra *Listeria monocytogenes*. Pereira et al (2019) elaborou revestimentos antimicrobianos de zeína plastificados com óleos essenciais de alho e tomilho, e observou que a mistura dos óleos essenciais nos revestimentos nas concentrações de 3 e 5% foram eficazes contra *Listeria monocytogenes*. Reis et al (2020) ao avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares e observou através do método disco de difusão o efeito do óleo essencial de tomilho contra *Listeria monocytogenes* em concentrações de 2,5%.

3.3 Análise sensorial

Na tabela 8 estão apresentados os percentuais das respostas “não e sim” e o tempo em segundos de resposta, para amostra de morangos com cobertura de alginato de sódio e ágar-ágar adicionados dos óleos essenciais. O tempo total do teste para todos consumidores foi de 5 a 8 minutos.

Coberturas de Alginato de Sódio

Nas amostras de morangos com cobertura de alginato, pode-se observar que em imagens que remetiam ‘parque, praça e praia’ apresentaram os maiores percentuais para a opção ‘sim’, sendo que nas palavras associativas os maiores percentuais para ‘não’ vêm de encontro às imagens, pois os consumidores não consideram que represente um ‘alimento contaminado, aspecto desagradável, impróprio para o consumo, intoxicação alimentar. Assim, as imagens provavelmente remetem a tranquilidade, alegria e nas palavras associativas ‘saudável, preservação de qualidade’.

Frutos de amora-preta minimamente processados, revestidos com alginato de sódio, apresentaram aceitação sensorial e características físicas e químicas semelhantes aos frutos *in natura* segundo estudo realizado por Meneghelet *al.* (2008).

No que diz respeito ao tempo de resposta, de acordo com o teste aplicado, a rapidez na associação está diretamente relacionada à convicção implícita na resposta. Maior rapidez nas respostas demonstra maior certeza, enquanto a demora na decisão remete a potenciais dúvidas geradas pela questão

Tabela 8 Resultados de “não e sim” e tempo de resposta no Teste de Associações Implícitas (TAI) em morangos com cobertura de alginato e morangos com cobertura de Ágar-ágar (n=45)

Imagens	Cobertura de Alginato				Cobertura de Ágar-ágar			
	Não (%)	Tempo/resposta (s)	Sim (%)	Tempo/resposta (s)	Não (%)	Tempo/resposta (s)	Sim (%)	Tempo/resposta (s)
Academia	58,3	032,26	41,7	137,58	33,3	081,31	66,7	297,36
Acidente	50,0	050,49	50,0	000,76	42,1	121,17	57,9	108,70
Aeroporto	68,3	041,96	31,7	374,54	60,0	076,22	40,0	223,12
Chuva	71,4	103,50	28,6	107,77	61,4	013,72	38,6	350,04
Dinheiro	51,5	004,20	48,5	439,89	39,2	122,98	60,8	125,54
Escola	65,2	116,68	34,8	323,24	39,5	109,93	60,5	164,94
Esporte	55,8	344,25	44,2	269,80	47,4	046,79	52,6	054,28
Festa	60,0	110,79	40,0	016,91	48,4	040,79	51,6	297,86
Flores	48,5	149,73	51,5	039,06	60,5	094,55	39,5	082,39
Neve	51,0	063,61	49,0	271,29	45,9	157,44	54,1	004,94
Parque	47,1	070,43	52,9	288,44	48,4	065,86	51,6	353,63
Praça	44,8	043,91	55,2	197,88	63,0	047,03	37,0	011,56
Praia	43,2	222,16	56,8	226,15	51,4	167,95	48,6	209,04
Shopping	66,7	197,81	33,3	413,09	55,8	088,61	44,2	206,46
Palavras associativas								
Alimento contaminado	63,9	108,60	36,1	054,01	51,4	329,67	48,6	188,15
Aspecto desagradável	63,3	045,20	36,7	158,97	37,5	033,65	62,5	192,02
Atrativo e apetitoso	75,6	093,24	24,4	236,50	52,4	104,51	47,6	245,68
Aumento de vida útil	50,9	123,45	49,1	110,69	37,5	287,87	62,5	136,08
Evitar consumo de bactérias	51,4	139,42	48,6	081,53	48,8	277,53	51,2	137,58
Impróprio para o consumo	61,0	006,48	39,0	105,76	50,0	181,80	50,0	082,43
Intoxicação alimentar	59,4	590,73	40,6	253,65	38,8	099,78	61,2	174,73
Não conserva	43,3	212,92	56,7	220,49	53,2	409,62	46,8	200,06
Preservação de qualidade	40,7	072,04	59,3	010,72	55,0	077,17	45,0	353,24
Saudável	40,5	088,14	59,5	501,65	57,9	036,41	42,1	226,52
Sem qualidade	50,0	066,80	50,0	011,32	70,4	028,14	29,6	001,59

Coberturas de Ágar-ágar

Nas amostras de morangos com cobertura de ágar-ágar, pode-se observar que nas imagens que remetiam 'academia, dinheiro e escola' apresentaram os maiores percentuais para a opção 'sim'. No que diz respeito às palavras associativas os maiores percentuais para 'não' foram conflitantes, observando-se o maior para a palavra "sem qualidade", seguidos de "saudável" e preservação da qualidade, o que leva ao entendimento de que o consumidor pode ter considerado o alimento como "sem qualidade" sendo possível que as imagens possam ter remetido à sensação de intranquilidade e tristeza. Em contrapartida 62,5% consideraram a opção "sim" associada ao aumento de qualidade e 51,2% também "sim" relacionado à possibilidade de evitar consumo de bactérias. Pelo tempo despendido pelos participantes nas respostas referentes à associação com palavras, pode-se perceber certa dificuldade na tomada de decisão a respeito desses questionamentos, demonstrando insegurança ao optar por uma das alternativas.

4. Conclusões

Com base no estudo desenvolvido é possível concluir que coberturas de alginato de sódio com adição de óleo essencial de tomilho e/ou de laranja doce mantêm as características físico-químicas e inibem o desenvolvimento de bactérias e fungos em morangos.

Morangos com coberturas de ágar-ágar ou alginato de sódio incorporados com óleo essencial de tomilho e/ou de laranja doce apresentam aceitação para o consumo, no entanto, à palatabilidade dos frutos com estes revestimentos não foi avaliada em razão da pandemia e, sendo necessário que outros trabalhos abordam mais especificamente este fator junto aos consumidores.

Morangos com coberturas incorporados com óleo essencial de tomilho e óleo essencial de laranja doce apresentaram efeito antimicrobiano frente à *Listeria monocytogenes*, quando a cobertura de alginato foi aplicada a posteriormente à contaminação dos frutos.

5. Referências

ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise** São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

GOMEZ-ALDAPA, C. A., PORTILLO-TORRES, L. A., VILLAGÓMEZ-IBARRA, J. R., RANGEL-VARGAS, E., TÉLLEZ-JURADO, A., CRUZ-GÁLVEZ, A., CASTRO-ROSAS, J. Survival of foodborne bacteria on strawberries and antibacterial activities of Hibiscus sabdariffa extracts and chemical sanitizers on strawberries. **Journal of food safety**, 2017.

ALVES, A. I.; , SARAIVA, S. H.; LUCIA, S. M. D.; TEIXEIRA, L. J. Q.; JUNQUEIRA, M. S. Qualidade De Morangos Envolvidos Com Revestimento Comestível Antimicrobiano À Base De Diferentes Fontes De Amido. **Centro Científico Conhecer** - Goiânia, vol.7, N.13; 2011.

ANTUNES, M. D., GAGO, C. M., CAVACO, A. M., MIGUEL, M. G. Edible Coatings Enriched with Essential Oils and their Compounds for Fresh and Fresh-cut Fruit. **Recent Patentson Food, Nutrition & Agriculture**, 4, 114-122. 2012.

ASSIS, O.B. G., BRITTO, D. Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações. **Brazilian Journal of Food Technology. Campinas**, v. 17, n. 2, p. 87-97, abr./jun. 2014.

CALEGARO, J.M.; PEZZI, E.; BENDER, R.J. Utilização de atmosfera modificada na conservação de morangos em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 37, n.8, p. 1-6, 2002.

CALO, J. R., CRANDALL, P. G., O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems- A review. **Food Control**, 54, 111-119.2005.

CASTRICINI, A.,D; M. S. C., Martins, R. N., & Santos, L. O. (2017). Morangos produzidos no semiárido de Minas Gerais: Qualidade do fruto e da polpa congelados. *Brazilian Journal of Food Technology*.

CUNHA JUNIOR, L.C.; JACOMINO, A.P.; OGASSAVARA, F.O.; TREVISSAN, M.J.; PARISI, M.C.M. Armazenamento refrigerado de morango submetido a altas concentrações de CO₂. *Hortic. bras.*, v. 30, n. 4, out. - dez. 2012

DANNEBERG, G.S., FUNCK, G.D., CRUXER, C.E., MARQUES, J.L., SILVA, W.P.S.; FIORENTIIL, A.M. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese, *LWT - Food Sci Technol*, V. 81 p.314-318, 2017

DOWNES, F.P.; ITO, H. (ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. 676 p.

ELDAHSHAN, O.A., HALIM, A.F. Comparison of the composition and antimicrobial activities of the essential oils of green branches and leaves of Egyptian navel orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. malesy), **Chemistry & Biodiversity**, 13, 681-685 (2016)

ETEBU, E.; NWAUZOMA. A. B. A Review On Sweet Orange (*Citrus Sinensis* L Osbeck): Health, Diseases And Management. **American Journal of Research Communication**, 2014, 2(2): 33-70.

EVERTON, G. O. *et al.* Caracterização química, atividade antimicrobiana e toxicidade dos óleos essenciais da Pimenta dioica L. (pimenta da Jamaica) e *Citrus sinensis* L. Osbeck (laranja doce), **Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.**, 49(3), 375-389 (2020)

GIL-GERALDO, E.Y.; DUQUE-CIFUENTES, A.L.; QUINTERO-CASTAÑO, V.D. Obtaining minimally processed strawberry (*Fragaria x ananassa*) products and their physicochemical, microbiological, and sensory characterization by using edible coatings. **Revista DYNA**, 85(207), pp. 183-191, Octubre - Diciembre, 2018.

GIMÉNEZ, B., LACEY, A.L., PÉREZ-SANTÍN, E., LÓPEZ-CABALLERO, M.E., MONTERO, P. Release of active compounds from agar and agar e gelatin films with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, 30, 264-271, 2013.

GOMES, A. Z. S.; TRIBESS, T. B.; SIERRA, L. B. V.; TADINI, C. C. **Características físicoquímicas e de firmeza da banana verde (*Musa sp.*, variedade nanica) não maturada durante o armazenamento.** Anais... São Carlos: DEQ – UFSCAR, 2007.

GREENWALD AG, MCGHEE DE, SCHWARTZ J. Measuring individual differences in implicit cognition: the Implicit Association Test. **J Pers Soc Psychol.** 1998;74(6):1464-80.

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

INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 60, de 23 de Dezembro de 2019.

MIYAGUE, L., MAITO, C. D., MACEDO, R. E. F. LUCIANO, F. B. Combination off henolicacids and essential oils against *Listeria monocytogenes*. **School of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine**, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil, 2013.

MARTINS, E. A.; *Listeria monocytogenes* em produtos fatiados do tipo READY-TO-EAT, presunto cozido e salame, comercializado no município de São Paulo, Ocorrência, Quantificação E Sorotipagem. **Tese de Doutorado. Faculdade de Saúde Pública.** São Paulo, 2009.

MARTINÉZ, K., ORTIZ, M., ALBIS, A., CASTAÑEDA, C.G.G., VALENCIA, M.E., TOVAR, C.D.G., The Effect of Edible Chitosan Coatings Incorporated with *Thymus capitatus* Essential Oil on the Shelf-Life of Strawberry (*Fragaria x ananassa*) during Cold Storage. **Biomolecules** 2018, 8, 155.

MENEGHEL, R.F.A., BENASSI, M.T., YAMASHITA, F. Revestimento comestível de alginato de sódio para frutos de amora preta (*Rubus ulmifolius*). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n.3, p. 609-618, jul./set. 2008.

MENDONÇA, J.N. Avaliação da qualidade de morangos recobertos com diferentes filmes biodegradáveis durante sua “shelf-life”. **Tese de conclusão de curso**. Patos de Minas. 2016

OLIVEIRA, J.F. Cobertura comestível de quitosana adicionada de óleo essencial de Sálvia *Sálvia esclareia* na conservação de morangos. **Tese de conclusão de curso**. Campo Mourão. 2017.

PEREIRA, L.A.S; SILVA, P.C; PAGNOSSA, J.P; MIRANDA, K.W.E; MEDEIROS, E.S; PICCOLI, R.H; OLIVEIRA, J.E. Revestimentos antimicrobianos de zeína plastificados com óleos essenciais de alho e tomilho. *Braz. J. Food Technol.*, Campinas, v. 22, e2018135, 2019.

POZZO, M.D.; VIÉGAS, J.; SANTURIO, D.F.; ROSSATO, L.; SOARES, I.H.; ALVES, S.H.; COSTA, M.T. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, v.41, n.4, p.667-672, 2011.

REIS, J.B, FIGUEIREDO, L.M., CASTORANI, G.M., VEIGA, S.M.O.M. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares. **Braz. J. Hea. Rev.**, Curitiba, v. 3, n. 1, p.342-363 jan./feb. 2020.

ROCHA, M.; ALEMÁN, A.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; MONTERO, M.P.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Atividade anti-hipertensiva de hidrolisados proteicos da castanha (*Umbrinacanosai*) incorporados em filmes de ágar após digestão gastrointestinal simulada. **XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos – SBCTA**, 2016.

ROCHA, R. P. da et al . Influência do processo de secagem sobre os principais componentes químicos do óleo essencial de tomilho. **Rev. Ceres**, Viçosa , v. 59, n. 5, p. 731-737, Oct. 2012 . Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-737X2012000500021&lng=en&nrm=iso . Acesso em 22 de dezembro de 2021. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2012000500021>.

RONQUE, E. R. V. A cultura do morangueiro. Curitiba: **EMATER-PR**, 1998. p. 183-202.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 296 p.

SIQUEIRA, M. G. F. M. **Pesquisa de *listeria ssp.* em áreas de processamento em estabelecimentos varejista de alimentos no estado do Pernambuco, Brasil.** 2013.

SHIGEMATSU, E. Coberturas comestíveis à base de alginato de sódio, quitosana e água de coco em cenouras (*Daucuscarota* L.) minimamente processadas: Avaliação de potencial probiótico e efeitos sobre parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais. **Repositório Institucional Unesp.** São José do Ribeirão Preto, 2017. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/150751> Acesso em: 03/01/2021.

SOLOMAKOS, N., GOVARIS, A., KOIDIS, P., BOTSOGLOW, N. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. **Meat Science** 80 (2008) 159-166.

VIEITES, R.L., EVANGELISTA, R.M., SILVA, C.S., MARTINS, M.L. Conservação do morango armazenado em atmosfera modificada. **Semina: Ciências Agrárias**, 27(2), 243-252. (2006).

8 Considerações finais

A principal vantagem da incorporação de óleos essenciais em matrizes poliméricas é que a taxa de difusão do agente antimicrobiano é constante, mantendo desse modo as altas concentrações de compostos ativos na superfície do produto, onde a contaminação é prevalente, por períodos de tempo prolongados. Com isso, o processo torna-se mais eficaz em reduzir os níveis de microrganismos do que quando aplicado diretamente na superfície do produto através de uma solução de pulverização (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2011).

A partir do estudo apresentado, verifica-se o grande potencial da utilização dos óleos essenciais em filmes elaborados com polímeros, por exemplo, o alginato de sódio, e a aplicação dos mesmos em frutas minimamente processadas, com intuito de prolongar sua vida útil e manter a inocuidade microbiológica.

Em função da Pandemia de COVID-19 não foi possível avançar muito na parte analítica, ficando para período posterior à pandemia a implementação de outras análises. Sugere-se em trabalhos futuros a utilização da microscopia eletrônica de varredura (MEV) para análise da estrutura das coberturas com óleo essencial. A MEV é um procedimento que permite a observação da superfície e da seção transversal dos filmes, o que leva a detecção de possíveis imperfeições estruturais das amostras, como o caso da homogeneidade, a integração entre compostos nos filmes e mesmo a presença de rupturas e falhas na sua superfície (D'AVIAL, 2010), bem como avaliação da qualidade da adesão do filme à superfície da fruta. Este procedimento, utilizado em alguns trabalhos, permitiu uma melhor avaliação da qualidade das coberturas no processo de conservação dos produtos.

Estudos apontam para a importância relativa à espessura do filme aplicado nas frutas, tendo em vista que quanto maior seu valor, mais eficaz a barreira aos gases e ao vapor d'água, perda de umidade. No entanto, do ponto de vista sensorial, um filme muito espesso não seria agradável ao paladar do consumidor. Um fator que pode ter contribuído para divergências de resultados

entre tratamentos é a falta de controle de espessura do filme por meio de micrografia, que conferiria uma maior precisão na padronização destes filmes.

Não foi possível estabelecer uma parceria com a Cooperativa de produtores de morango como inicialmente previsto, com isso os morangos foram adquiridos nos estabelecimentos comerciais da cidade de Pelotas-RS. Por terem sido adquiridos no mercado, em diferentes períodos e sem o conhecimento do tratamento atribuído aos frutos durante a produção, algumas pequenas interferências podem ter ocorrido e contribuído para divergências entre nossos achados e os de outros autores.

Comparativamente, as coberturas de alginato demonstraram-se mais efetivas na diminuição da perda de massa dos frutos do que as de ágar-ágar, com ou sem óleos essenciais e, com relação aos óleos essenciais, o detomilho demonstrou uma melhor atividade antimicrobiana. Isto pode estar relacionado ao fato já relatado que OEs ricos em aldeídos e fenóis como o cinamaldeído, citral, carvacrol, eugenol e timol demonstram uma maior atividade antimicrobiana (Bassolé & Juliani, 2012), com maior efeito contra as bactérias Gram-positivas (Hyltdgaard et al., 2012).

Acredita-se na importância da continuidade dos estudos relativos às coberturas comestíveis e, principalmente, a sua associação com diferentes óleos essenciais na expectativa de prolongar o tempo de vida de prateleira dos frutos minimamente processados. Ainda com todas as dificuldades encontradas em razão do contexto pandêmico que predominou durante os estudos, avaliou-se positivamente a presente pesquisa, em especial do ponto de vista da capacidade de enfrentar adversidades e, ainda assim, concluir-se aquilo a que se propôs.

Espera-se que esse estudo sirva de base para muitos outros que devem ainda ser realizados, com o aprimoramento das técnicas e aperfeiçoamento das análises a fim de que se alcance cada vez mais a excelência neste campo de atuação.

9 Referências bibliográficas

ABNT. NBR 12994: Métodos de análise sensorial dos alimentos e bebidas. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Rio de Janeiro, 1993.

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

ADITIVOS & INGREDIENTES. Ágar ou ágar-ágar, o mais antigo ficocolóide, 2012, ed 87, 31-30p. Disponível em: <http://insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/87.pdf Acesso em: 27 mai. 2019.

ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ALDAPA, C. A. G., TORRES, L. A. P., IBARRA, J. R. V. G., VARGAS, E. R., JURADO, A. T., ALVEZ, A. C. G., ROSAS, J. C. Survival of foodborne bacteria on strawberries and antibacterial activities of Hibiscus sabdariffa extracts and chemical sanitizers on strawberries. *Journal of food safety*, 2017.

ALI, J.; KHAN, A.; ULLAH, N.; AMIN, A.; RAHMAN, Z.; KHAYAM, S. M. U.; KHAN, F. A.; HUSSAIN, A.; KHURRAM, M.; QUARASHI, M. N. A. Essential oil chemical composition and Antimicrobial Activity of Sour Oranges (*Citrus aurantium*) Peels. *Journal of Pharmacy Research* Vol.5 Issue3. March 2012.

ALVES, A. I., SARAIVA, S. H., LUCIA, S. M. D., TEIXEIRA, L. J. Q.; JUNQUEIRA, M. S. Qualidade De Morangos Envolvidos Com Revestimento Comestível Antimicrobiano À Base De Diferentes Fontes De Amido. *Centro Científico Conhecer - Goiânia*, vol.7, N.13; 2011.

ANTUNES, M. D., GAGO, C. M., CAVACO, A. M., MIGUEL, M. G. Edible Coatings Enriched with Essential Oils and their Compounds for Fresh and Fresh-cut Fruit. *Recent Patentson Food, Nutrition & Agriculture*, 4, 114-122. 2012.

ASSIS, O.B. G., BRITTO, D. Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações. *Brazilian Journal of Food Technology*. Campinas, v. 17, n. 2, p. 87-97, abr./jun. 2014.

BRASIL, Resolução-Rdc Nº 12, De 02 De Janeiro De 2001. Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos. Disponível em:

BURALL, L. S., GRIM, C. J., DATTA, A. R. A clade of *Listeria monocytogenes* serotype 4b variant strains linked to recent listeriosis outbreaks associated with produce from a defined geographic region in the US. *Plos one*, 12(5), 2017.

CALEGARO, J.M.; PEZZI, E.; BENDER, R.J. Utilização de atmosfera modificada na conservação de morangos em pós-colheita. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, v. 37, n.8, p. 1-6, 2002.

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. . Essential oils as antimicrobials in food systems- A review. *Food Control*, 54, 111-119.2015

CASTRICINI, A.,D;, M. S. C., Martins, R. N., & Santos, L. O. (2017). Morangos produzidos no semiárido de Minas Gerais: Qualidade do fruto e da polpa congelados. *Brazilian Journal of Food Technology*.

CELIKEL, N., KAVA, G. Antimicrobial Properties of Some Essential Oils against Some Pathogenic Microorganisms. *Czech J. Food Sci.* Vol. 26, No. 3: 174–181, 2008.

CUNHA JUNIOR, L.C.; JACOMINO, A.P.; OGASSAVARA, F.O.; TREVISSAN, M.J.; PARISI, M.C.M. Armazenamento refrigerado de morango submetido a altas concentrações de CO₂. *Hortic. bras.*, v. 30, n. 4, out. - dez. 2012.

DANNEBERG, G.S., FUNCK, G.D., CRUXER, C.E., MARQUES, J.L., SILVA, W.P.S.; FIORENTIIL, A.M. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese, *LWT - Food Sci Technol*, V. 81 p.314-318, 2017

DIEL, M. I., PINHEIRO, M. V. M., THIESEN, L. A., ALTÍSSIMO, B. S., HOLZ, E., SCHIMIDT, D. Cultivation of strawberry in substrate: Productivity and fruit quality are affected by the cultivar origin and substrates. *Ciência e Agrotecnologia*, 42(3): 229-239, 2018.

DOWNES, F.P.; ITO, H. (ed.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4th ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. 676 p.

ELDAHSHAN, O.A., HALIM, A.F. Comparison of the composition and antimicrobial activities of the essential oils of green branches and leaves of Egyptian navel orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. malesy), *Chemistry & Biodiversity*, 13, 681-685 (2016)

ETEBU, E.; NWAUZOMA. A. B. A Review On Sweet Orange (*Citrus Sinensis* L Osbeck): Health, Diseases And Management. *American Journal of Research Communication*, 2014, 2(2): 33-70.

EVERTON, G. O. et al. Caracterização química, atividade antimicrobiana e toxicidade dos óleos essenciais da Pimenta dioica L. (pimenta da Jamaica) e *Citrus sinensis* L. Osbeck (laranja doce), *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, 49(3), 375-389 (2020)

FERREIRA, A. B.,ALVARENGA, S. H. F., SÃO JOSÉ, J. F. B. Quality of organic fruits and vegetables sold in street markets. *RevInst Adolfo Lutz*, 74(4):410-9, 2015.

FERREIRA, D. M. O. Extração de agar de algas vermelhas do gênero *Gracilaria*. Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, 2015.

FERREIRA, V.; WIEDMANN M.; TEIXEIRA, P.; STASIEWICZ J. *Listeria monocytogenes* Persistence in Food-Associated Environments: Epidemiology, Strain Characteristics, and Implications for Public Health. *Journal of Food Protection*, Vol. 77, No. 1, p. 150–170, 2014.

FRANCO, B.D.G.M; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. 1ªEd, Editora Atheneu: São Paulo. 2016.

GALINDO, M. V., *Filmes biodegradáveis de gelatina e quitosana com adição de óleos essenciais na conservação de presunto embalado a vácuo*. Universidade Tecnológica do Paraná, 2017.

GARCIA, L. C., *Aplicação de coberturas comestíveis em morangos minimamente processados*. 2006.

GIAMPIERI, F.; TULIPAN, S.; ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; QUILES, J. L.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition* 28, 9–19, 2012.

GIL-GERALDO, E.Y.; DUQUE-CIFUENTES, A.L.; QUINTERO-CASTAÑO, V.D. Obtaining minimally processed strawberry (*Fragaria x ananassa*) products and their physicochemical, microbiological, and sensory characterization by using edible coatings. *Revista DYNA*, 85(207), pp. 183-191, Octubre - Diciembre, 2018.

GIMÉNEZ, B., LACEY, A.L., PÉREZ-SANTÍN, E., LÓPEZ-CABALLERO, M.E., MONTERO, P. Release of active compounds from agar and agar egeletin films with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 30, 264-271, 2013.

GOMES, A. Z. S.; TRIBESS, T. B.; SIERRA, L. B. V.; TADINI, C. C. Características físicoquímicas e de firmeza da banana verde (*Musa sp.*, variedade nanica) não maturada durante o armazenamento. *Anais... São Carlos: DEQ – UFSCAR*, 2007.

GOMEZ-ALDAPA, C.A, PORTILLO-TORRES, L.A, VILLAGOMEZ-IBARRA, J.R, RANGEL-VARGAS, E., TELLEZ-JURADO, A., CRUZ-GÁLVEZ, A., CASTRO-ROSAS, J. Survival of foodborne bacteria on strawberries and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* extracts and chemical sanitizers on strawberries. *J Food Saf.* 2017;38:e12378.

GREENWALD AG, MCGHEE DE, SCHWARTZ J. Measuring individual differences in implicit cognition: the Implicit Association Test. *J Pers Soc Psychol.* 1998;74(6):1464-80.

GUIMARÃES, A. G. *Produtividade, qualudadde e conservação pós colheita de frutos de diferentes cultivares de morangueiro*. Diamantina - MG, 2013.

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

HALTER, E. L., NEUHAUS, K., & SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemnatisulca* of a German fresh water pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.63, p.641-647, 2013.

JAY, J.M. *Microbiologia de alimentos*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 711p 2005.

JEYALTCHUMI, P., TUNUNG, R., MARGARET, S. P., SON, R., FARINAZLEEN, M. G., CHEAH, Y. K. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *International Food Research Journal* 17: 1-11, 2010.

KAVANAUGH, N. L., RIBBECK, K. Selected Antimicrobial Essential Oils Eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* V. 78, p. 4057–4061, 2012.

KEMPKA, A.P., SANTÍN, L., BETIOLO, C., PRESTES, R.C. Desenvolvimento de cobertura à base de colágeno parcialmente hidrolisado, manitol e antimicrobianos aplicada em morangos. *B.CEPPA*, Curitiba, v. 30, n. 1, p. 53-64, jan./jun. 2012.

LUKSIENE Z., PASKEVICIUTE, E. Novel approach to the microbial decontamination of strawberries: chlorophyllin-based photosensitization. *Journal of Applied Microbiology* 110, 1274–1283, 2011.

MARTINS, E. A.; *Listeria monocytogenes* em produtos fatiados do tipo READY-TO-EAT, presunto cozido e salame, comercializado no município de São Paulo, Ocorrência, Quantificação E Sorotipagem. Tese de Doutorado. Faculdade de Saúde Pública. São Paulo, 2009.

MARTÍNEZ, K., ORTIZ, M., ALBIS, A., CASTAÑEDA, C.G.G., VALENCIA, M.E., TOVAR, C.D.G., The Effect of Edible Chitosan Coatings Incorporated with *Thymus capitatus* Essential Oil on the Shelf-Life of Strawberry (*Fragaria x ananassa*) during Cold Storage. *Biomolecules* 2018, 8, 155.

MENEGHEL, R.F.A., BENASSI, M.T., YAMASHITA, F. Revestimento comestível de alginato de sódio para frutos de amora preta (*Rubus ulmifolius*). *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 29, n.3, p. 609-618, jul./set. 2008.

MIYAGUE, L., MAITO, C. D., MACEDO, R. E. F. LUCIANO, F. B. Combination of henolicacids and essential oils against *Listeria monocytogenes*. School of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil, 2013.

ORNELAS-PAZ, J. J., YAHIA, E. M.; RAMÍREZ-BUSTAMANTE N.; PÉREZ-MARTÍNEZ J. D.; ESCALANTE-MINAKATA M. P.; IBARRA-JUNQUERA, V.;

ACOSTA-MUÑIZ C.; GUERRERO-PRIETO, V.; OCHOA-REYES, E. Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria xananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. *Food Chemistry* 138 (2013) 372–381, 2015.

PARREIDT, T. S., MULLER, K., SCHMID, M. Alginate-Based Edible Films and Coatings for Food Packaging Application. *Foods*, 2018.

PEREIRA, L.A.S; SILVA, P.C; PAGNOSSA, J.P; MIRANDA, K.W.E; MEDEIROS, E.S; PICCOLI, R.H; OLIVEIRA, J.E. Revestimentos antimicrobianos de zeína plastificados com óleos essenciais de alho e tomilho. *Braz. J. Food Technol., Campinas*, v. 22, e2018135, 2019.

PINEAU, N.; CORDELLE, S.; SCHLICH, P. Temporal dominance of sensations: a new technique to record several sensory attributes simultaneously over time. In: 5TH PANGBORN SENSORY SCIENCE SYMPOSIUM, 2003, Boston. Apresentação Boston: PANGBORN, 2003.

POZZO, M.D.; VIÉGAS, J.; SANTURIO, D.F.; ROSSATO, L.; SOARES, I.H.; ALVES, S.H.; COSTA, M.T. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina. *Ciência Rural*, v.41, n.4, p.667-672, 2011.

PRATES, M. F. O.; ASCHERI, D. P. R.; Efeito da Cobertura de Amido de Fruta-De-Lobo E Sorbitol E Do Tempo De Armazenamento Na Conservação Pós-Colheita De Frutos De Morango. *B.CEPPA, Curitiba*, v. 29, n. 1, p. 21-32, jan./jun. 2011.

RAGHAV, P. K.; AGARWAL, N.; SAINI, M. Edible Coating of Fruits And Vegetables: A Review. *International Journal of Scientific Research and Modern Education*. Vol 1, 2016.

REIS, J.B, FIGUEIREDO, L.M., CASTORANI, G.M., VEIGA, S.M.O.M. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares. *Braz. J. Hea. Rev., Curitiba*, v. 3, n. 1, p.342-363 jan./feb. 2020.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria de Saúde. Portaria 20 de 2017. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação e de Procedimentos Operacionais Padronizados para a industrialização de frutas e vegetais minimamente processados e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de frutas e vegetais minimamente processados. Disponível em: <https://saude.rs.gov.br/upload/arquivos/carga20170437/13053734-1489756663-90-cevs.pdf> Acesso em 12 de setembro de 2020.

ROCHA, M.; ALEMÁN, A.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; MONTERO, M.P.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Atividade anti-hipertensiva de hidrolisados proteicos da castanha (*Umbrinacanosai*) incorporados em filmes de ágar após digestão gastrointestinal

simulada. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos – SBCTA, 2016.

ROCHA, R. P. et al. Influência do processo de secagem sobre os principais componentes químicos do óleo essencial de tomilho. *Rev. Ceres, Viçosa*, v. 59, n. 5, p. 731-737, Oct. 2012. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-737X2012000500021&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 22 de dezembro de 2021. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2012000500021>.

RONQUE, E. R. V. A cultura do morangueiro. Curitiba: EMATER-PR, 1998. p. 183-202.

ROWLANDS, R. E. G.; Caracterização fenotípica e genotípica de *Listeria monocytogenes* isolada de produtos cárneos cruz comercializados no Município de São Paulo. São Paulo, 2013.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 296 p.

SIQUEIRA, M. G. F. M. Pesquisa de listeriassp. em áreas de processamento em estabelecimentos varejista de alimentos no estado do Pernambuco, Brasil. 2013.

SHIGEMATSU, E. Coberturas comestíveis à base de alginato de sódio, quitosana e água de coco em cenouras (*Daucuscarota L.*) minimamente processadas: Avaliação de potencial probiótico e efeitos sobre parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais. Repositório Institucional Unesp. São José do Ribeirão Preto, 2017. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/150751> Acesso em: 03/01/2021.

SOLOMAKOS, N., GOVARIS, A., KOIDIS, P., BOTSOGLOW, N. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science* 80 (2008) 159-166.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science* .Vol. 79, Nr. 7, 2014.

VÁZQUEZ-BOLAND, J.A.;KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; WERNER GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B., WEHLAND; J., KREFT, J. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 584–640 Vol. 14, No. 3, 2001.

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

VIEITES, R.L., EVANGELISTA, R.M., SILVA, C.S., MARTINS, M.L.
Conservação do morango armazenado em atmosfera modificada. *Semina: Ciências Agrárias*, 27(2), 243-252. (2006).