**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**

Desenvolvimento de partículas contendo óleos essenciais de eucalipto para o controle de *Rhizopus stolonifer* em morango (*Fragaria* sp.)

Anaíle dos Mares Biazotto

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2019**

Anaíle dos Mares Biazotto
Bacharela em Ciências dos Alimentos

Desenvolvimento de partículas contendo óleos essenciais de eucalipto para o controle de *Rhizopus stolonifer* em morango (*Fragaria* sp.)

Orientadora:
Profa. Dra. **MARTA HELENA FILLET SPOTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Biazotto, Anaile dos Mares

Desenvolvimento de partículas contendo óleos essenciais de eucalipto para o controle de *Rhizopus stolonifer* em morango (*Fragaria* sp.) / Anaile dos Mares Biazotto. - - Piracicaba, 2019.

87 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Capacidade antifúngica 2. Pós-colheita 3. *Eucalyptus staigeriana* 4. *Eucalyptus citriodora* 5. *Eucalyptus globulus* 6. Spray drying I. Título

Dedicatória

Dedico aos meus pais Eliana dos Mares e José Luiz Biazotto,
por todo o aprendizado que levarei para a vida.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado que me possibilitou a realização deste trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Marta Helena Fillet Spoto, pelas oportunidades e conhecimento durante esse período. Levarei estes ensinamentos para meu crescimento pessoal e profissional.

À Pós-doc Paula Porrelli Moreira da Silva e Dra. Jacqueline de Oliveira, pela ajuda e companheirismo fundamentais durante estes últimos anos.

Aos pesquisadores Dr. Eduardo Micotti e Dra. Izabela Alvim pelos aconselhamentos e auxílios durante esta etapa.

Aos funcionários do Serviço de Pós-Graduação e a Seção de Apoio à Pós-graduação por todo auxílio e aos funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, em especial Regina Marafon, Rodrigo Gullo e Ana Paula Meneguetti.

Aos alunos de graduação que estiveram no Laboratório de Frutas e Hortaliças durante a realização deste trabalho: Luana Borges, Júlia Delgado, Fabiane Maximo, João Pedro Sábio, Juliana Vetucci, Danyela Guidelli, Leticia Maria, Caio Dizeró e Bruna Daniel.

A todo o time GEFH (Grupo de Extensão em Frutas e Hortaliças) pelo apoio nos experimentos, pela convivência agradável e pelo espírito de equipe.

Ao Laboratório de Frutas e Hortaliças por todo o suporte estrutural e financeiro para a realização desse projeto.

A todos os amigos que estiveram ao meu lado durante esse tempo, em especial Carolina Prando, Juliana Vetucci, Fabiane Maximo, Vitoria Veiga, Danyela Guidelli, Luiz Gustavo, Iris Gabrielle e Elaine Crespim.

A ESALQ, instituição maravilhosa, por todas as oportunidades e pelos excelentes professores.

Quando uma porta se fecha, outra se abre. Mas muitas vezes nós ficamos olhando tanto tempo, tristes, para a porta fechada que nem notamos aquela que se abriu.
(Alexander Graham Bell)

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivos específicos.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1. Morango	15
3.2. Óleos essenciais	16
3.2.1. Óleos essenciais de espécies de <i>Eucalyptus staigeriana</i> , <i>Eucalyptus citriodora</i> e <i>Eucalyptus globulus</i>	18
3.3. Microencapsulação.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Local.....	23
4.2. Obtenção dos óleos essenciais de <i>E. staigeriana</i> , <i>E. citriodora</i> , <i>E. globulus</i>	23
4.3. Obtenção e identificação molecular do isolado fúngico	24
4.4. Armazenamento do fungo	25
4.5. Encapsulação dos óleos essenciais	26
4.5.1. Caracterização das micropartículas	28
4.6. Composição química dos OEs livres e das partículas contendo OE de <i>E. staigeriana</i> , <i>E. citriodora</i> e <i>E. globulus</i>	31
4.7. Avaliação da eficiência <i>in vitro</i> dos óleos essenciais sobre o <i>Rhizopus stolonifer</i>	32
4.7.1. Eficiência <i>in vitro</i> por contato dos óleos essenciais (OEs) livres	32
4.7.2. Eficiência <i>in vitro</i> por exposição aos voláteis dos OEs livres	34
4.7.3. Eficiência <i>in vitro</i> por exposição aos voláteis das partículas contendo OEs.....	35
4.8. Avaliação da eficiência <i>in vivo</i> das partículas sobre <i>Rhizopus stolonifer</i> ...	35
4.9. Avaliação da qualidade físico-química e sensorial de morangos tratados com partícula contendo <i>E. citriodora</i>	38
4.9.1. Análises físico-químicas	40
4.9.2. Análise sensorial: teste de diferença de controle	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45

5.1. Caracterização das partículas contendo óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> , <i>E. citriodora</i> e <i>E. globulus</i>	45
5.1.1. Eficiência da encapsulação (EE)	45
5.1.2. Tamanho de partículas	46
5.1.3. Umidade e atividade de água (AA)	49
5.1.4. Microscopia Eletrônica de Varredura	50
5.2. Composição química dos OEs livres e das partículas contendo OE de <i>E. staigeriana</i> , <i>E. citriodora</i> e <i>E. globulus</i>	52
5.3. Avaliação da eficiência <i>in vitro</i> dos óleos essenciais sobre <i>Rhizopus stolonifer</i>	57
5.3.1. Eficiência <i>in vitro</i> por contato dos óleos essenciais (OES) livres	57
5.3.2. Eficiência <i>in vitro</i> por exposição aos voláteis dos óleos essenciais livres	59
5.3.3. Eficiência <i>in vitro</i> por exposição aos voláteis das partículas contendo OEs	60
5.4. Avaliação da eficiência <i>in vivo</i> das partículas <i>Rhizopus stolonifer</i>	62
5.5. Avaliação da qualidade físico-química e sensorial de morangos tratados com partícula contendo <i>E. citriodora</i>	66
5.5.1. Análises físico-químicas	66
5.5.2. Análise sensorial: teste de diferença de controle	71
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
7. CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	77
ANEXO	87

RESUMO

Desenvolvimento de partículas contendo óleo essencial de eucalipto para controle de *Rhizopus stolonifer* em morango (*Fragaria* sp.)

O morango é uma fruta de grande importância comercial, sensorialmente apreciada e que fornece diversos nutrientes. Entretanto, sua vida útil é limitada devido a sua perecibilidade e susceptibilidade a doenças fúngicas, sendo o prolongamento de sua vida pós-colheita um desafio. Frente ao uso irregular de fungicidas não registrados na pós-colheita de morangos, óleos essenciais (OEs) de eucalipto têm conhecido poder antifúngico, podendo ser utilizados como alternativa para o controle de fungos na pós-colheita de morango. Entretanto, se aplicados diretamente na fruta, podem causar danos no fruto, assim a utilização da microencapsulação surge como uma alternativa para aumentar a estabilidade e controlar a liberação dos óleos essenciais. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo desenvolver um produto microencapsulado com base em óleo essencial, que apresente capacidade de controlar o fungo *Rhizopus stolonifer* na vida pós-colheita de morango. Para isso, foram utilizados óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* e foi avaliada a microencapsulação como técnica de incorporação do óleo essencial. Inicialmente, verificou-se em teste *in vitro*, a capacidade antifúngica dos óleos essenciais livres de *E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus* sobre o fungo *R. stolonifer* isolado de morangos. A seguir, foi avaliada a eficiência antifúngica das partículas contendo OEs em testes *in vitro* e *in vivo*, onde se selecionou a partícula que apresentou a melhor capacidade antifúngica. Então, os morangos submetidos ao tratamento com OEs microencapsulados foram avaliados quando as características físico-químicas (perda de massa, cor, ratio, pH, firmeza, degradação por fungos, compostos fenólicos e antocianinas) e sensoriais, durante o período de armazenamento de 18 dias em temperatura de refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$). Como resultados, a composição química dos óleos essenciais de *E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus* apresentaram limonene, citronellal e o 1,8-cineole como compostos majoritários, respectivamente. Foi possível afirmar que a combinação de goma arábica e óleos essenciais mostrou-se uma boa alternativa para a proteção dos OEs. Os OEs de *E. staigeriana* e *E. citriodora* e suas partículas apresentaram a maior capacidade de inibição de crescimento fúngico, uma vez que os OEs exibiram as menores CIM, para o ensaio *in vitro*. Durante o experimento de eficiência *in vivo*, os tratamentos OE livre e partícula de *E. citriodora* apresentaram a melhor ação antifúngica quando comparados com o OE de *E. staigeriana*. No experimento pós-colheita, os morangos tratados com a partícula de *E. citriodora* apresentaram redução da degradação fúngica durante o armazenamento refrigerado, indicando conservação da sua qualidade. Já para os parâmetros físico-químicos (cor, firmeza, pH, ratio, antocianinas e compostos fenólicos), não houve alteração quando comparados aos demais tratamentos. No entanto, a avaliação sensorial evidenciou alteração da cor, aroma e aparência dos morangos tratados com OE livre e encapsulados. Dessa forma, o uso de OEs microencapsulados é uma alternativa potencial aos fungicidas sintéticos para o controle pós-colheita da podridão mole em morangos.

Palavras-chave: Capacidade antifúngica; Pós-colheita; *Eucalyptus staigeriana*; *Eucalyptus citriodora*; *Eucalyptus globulus*; Spray drying

ABSTRACT

Development of particles containing eucalyptus essential oil for control of *Rhizopus stolonifer* in strawberry (*Fragaria* sp.)

The strawberry is a fruit that has a huge commercial importance, sensory appreciate and provides many nutrients. However, the lifetime of the strawberry is limited due the perishability and susceptibility to fungal diseases, becoming a challenge to extend the postharvest life of it. Facing the irregular use of fungicides that doesn't have register at the postharvest of strawberries, essential oils (EO) of eucalyptus is known for the antifungal power and can be used as alternative for the fungus control at the postharvest. However, if directly applied into the fruit, it can cause food damages. Therefore, the use of microencapsulation is an efficient method to increase the stability and also to control the release of the essential Oils. For this reason, this dissertation has as objective the developing of a microencapsulated product based at the essential oil, that could be able to control the *Rhizopus stolonifer* fungus at the postharvest of the Strawberry. Therefore, essential oils were utilized, extracted from the leafs of *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus citriodora* and *Eucalyptus globulus*. The microencapsulation was evaluated as incorporation technique of the essential oil. Initially, it was verified through test *in vitro*, the antifungal capacity of the essential Oils extrated (*E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus*) into fungus *R. stolonifer*, isolated of the strawberries. After that, it was evaluated the antifungal efficiency of the particles through tests *in vitro* and *in vivo*, where was chosen which presented the best antifungal capacity. Therefore, strawberries submitted to treatment with microencapsulated EO were evaluated when physical-chemical characteristics (loss of mass, color, ratio, pH, firmness, degradation by fungi, phenolic compounds and anthocyanins) and sensorial characteristics were observed in fresh organic strawberries during the storage period of 18 days at refrigeration temperature (5 ± 1 ° C).As a result, the chemical composition of the essential oils of *E. staigeriana*, *E. citriodora* and *E. globulus* presented limonene, citronellal and 1,8-cineole as major compounds, respectively. It was possible to affirm that the combination of gum arabic and essential oils proved to be a good alternative for the protection of OEs. OEs of *E. staigeriana* and *E. citriodora* and their particles showed the greatest capacity for inhibition of fungal growth, since EO exhibited the smallest MICs for the *in vitro* assay. During the *in vivo* efficiency experiment, free EO and *E. citriodora* particle treatments showed the best antifungal action when compared to EO. From *E. staigeriana*. In the postharvest experiment, strawberries treated with the *E. citriodora* particle showed reduction of fungal degradation during refrigerated storage, indicating conservation of their quality. As for the physical-chemical parameters (color, firmness, pH, ratio, anthocyanins and phenolic compounds), there was no change when compared to the other treatments. However, the sensorial evaluation evidenced alteration of the color, aroma and appearance of strawberries treated with free and encapsulated EO. Thus, the use of microencapsulated EO is a potential alternative to synthetic fungicides for post-harvest control of soft rot in strawberries.

Keywords: Antifungal capacity; Post-harvest; *Eucalyptus staigeriana*; *Eucalyptus citriodora*; *Eucalyptus globulus*; Spray drying

1. INTRODUÇÃO

O desperdício de alimentos representa grande impacto na qualidade e na segurança alimentar, representando perda de valor econômico e recursos, além de ser um obstáculo no desenvolvimento econômico (MARELLI et al., 2016). De acordo com estimativas realizadas pela Food and Agriculture Organization (FAO, 2013), um terço dos alimentos produzidos anualmente são desperdiçados, devido principalmente às perdas nas fases de produção, pós-colheita, armazenamento e transporte. As frutas e hortaliças contribuem para 45% desse desperdício durante a cadeia pós-colheita, com perdas principalmente nas fases de distribuição e consumo, as quais ocorrem devido a fatores como alta fragilidade e reduzida vida útil (MATAR et al., 2018).

O morango é uma fruta de importância econômica a nível mundial, sendo muito apreciada comercialmente, no entanto, é um produto de alta perecibilidade no mercado *in natura* devido às elevadas taxas respiratórias e metabólicas, sendo ainda influenciado principalmente pela temperatura de armazenamento e deterioração microbiológica (PERETTO et al., 2014). Entretanto, algumas práticas utilizadas como os cuidados no manuseio e o armazenamento em baixas temperaturas, são insuficientes para assegurar a qualidade do morango *in natura*, principalmente no que se refere à incidência de doenças fúngicas.

A utilização de cultivares resistentes para o controle de doenças em morangueiros é limitada e ainda é observada a inexistência de fungicidas específicos oficialmente recomendados para o controle de determinada doença fúngica (DIAS-ARIEIRA et al., 2010). Em virtude da crescente preocupação com as alterações ambientais e da utilização sustentável dos recursos naturais, são necessárias pesquisas voltadas para a prospecção de produtos naturais, visando principalmente, à minimização do uso de produtos sintéticos (MORAES et al., 2008).

Neste contexto, a utilização de substâncias extraídas de plantas, na forma de óleos essenciais, tem inúmeras vantagens quando comparadas ao emprego de inseticidas ou fungicidas sintéticos, principalmente quanto à biodegradabilidade (LABINAS e CROCOMO, 2002).

Os estudos com óleos essenciais extraídos de folhas de eucalipto no controle de fungos na pós-colheita de frutas ainda são escassos. Contudo, pesquisas têm

demonstrado propriedades antimicrobianas desses óleos contra microrganismos em geral (ELAISSI et al., 2011; GILLES et al., 2010).

Apesar do potencial apresentado pelos OEs para o controle de doenças, sua utilização é limitada pelo aroma intenso e toxicidade potencial. Neste contexto, a microencapsulação é alternativa eficiente para aumentar a estabilidade física dos óleos essenciais, protegendo-os de interações prejudiciais com componentes dos alimentos e do ambiente, além de aumentar a sua bioatividade (DONSÌ et al., 2011; POLK et al., 1994). Após a microencapsulação, o composto bioativo pode ser facilmente manipulado, uma vez que seu princípio ativo está protegido contra a oxidação e outros danos ambientais. Além disso, os seus compostos voláteis são retidos em uma matriz, apresentando eficácia prolongada (NEETHIRAJAN; JAYAS, 2011).

2. OBJETIVOS

Desenvolvimento de um produto microencapsulado com base em óleo essencial de eucalipto, que tenha a capacidade de controlar o fungo *Rhizopus stolonifer* na vida pós-colheita de morango. Para isso, foram utilizados óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus*. Foi verificada a capacidade antifúngica de cada produto a partir de métodos baseados em testes *in vitro* e *in vivo* contra *R. stolonifer*. Por último, foi avaliada a qualidade fisiológica e físico-química do morango tratado com o produto durante o período de armazenamento sob refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$).

2.1. Objetivos específicos

- Verificou-se em testes *in vitro* a capacidade antifúngica dos óleos essenciais de *E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus* sobre o fungo *R. stolonifer*, isolado de morangos;
- Avaliou-se a eficiência antifúngica em testes *in vitro* das partículas produzidas com os óleos essenciais de *E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus* sobre o fungo *R. stolonifer* isolado de morangos;
- Caracterização da composição química dos óleos essenciais livres e encapsulados;
- Avaliou-se a eficiência antifúngica em testes *in vivo* das partículas produzidas com os óleos essenciais de *E. staigeriana* e *E. citriodora* sobre o fungo *R. stolonifer* isolado de morangos;
- Seleção da partícula que apresentou melhor capacidade antifúngica e realização da aplicação da partícula previamente selecionada nos morangos *in natura* para avaliação das características fisiológicas, físico-químicas e sensoriais da fruta durante o período de armazenamento de 18 dias em temperatura de refrigeração.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Morango

O morangueiro é uma planta herbácea, rasteira e perene, que pertence ao gênero *Fragaria* spp, e produz pseudofrutos a partir da expansão de seu receptáculo floral (DUARTE-MOLINA et al., 2016; RUBINSTEIN, 2015). É uma espécie muito apreciada em todo o Brasil, devido as suas características e pelo seu aspecto atraente e sabor agradável, sendo consumido *in natura* ou processado (MADAIL et al., 2007). Possuem características únicas de cor, sabor, aparência, sendo também uma rica fonte de potássio, vitamina C, vitamina E, ácido fólico, carotenoides e compostos fenólicos (BHAT; STAMMINGER, 2015; YANG et al., 2016).

O morango tem padrão respiratório não-climatérico, apresentando declínio constante na taxa respiratória pós-colheita, amadurecendo quando ainda está ligado à planta, não produz etileno após a colheita, e se constitui em um produto altamente perecível (GREENSHIELDS et al., 2016), além de estar sujeito a diversas infecções fúngicas que incidem desde a muda recém-plantada, até os frutos maduros, causando prejuízos na comercialização e na sua vida de prateleira (CHITARRA; CHITARRA, 1990; GOUVEA, 2007).

A podridão mole é uma doença fúngica com grande incidência em morango na pós-colheita e que causa grandes perdas, sendo ocasionada pelo fungo *Rhizopus stolonifer*, que causa aspecto aquoso. Essa é uma doença mais severa durante o armazenamento e a comercialização das frutas (ANTUNES; REISSER JÚNIOR; SCHWENGBER, 2016; OLIVEIRA et al., 2011).

Dessa forma, o controle da degradação fúngica pós-colheita em morango é dependente do uso de fungicidas, que são aplicados de maneira incorreta e excessiva, ocasionando problemas de contaminação, além do surgimento de resistência de fungos a determinados princípios ativos. Assim, a procura de alternativas a esses produtos é indispensável, em virtude dos efeitos negativos causados ao ambiente, à saúde humana e ao desenvolvimento de resistência dos patógenos a eles (GHINI; KIMATI, 2000; GIL; HOLCROFT; KADER, 1997). Nesse contexto, os produtos bioativos naturais extraídos das plantas representam uma rica fonte de potenciais agentes de controle de doenças como, por exemplo, os óleos essenciais (YANG et al., 2016).

3.2. Óleos essenciais

Matérias-primas vegetais estão sendo explorados como pesticidas biorracionais em programas integrados de proteção de plantas e estudados no desenvolvimento de novos produtos para conservação de alimentos, que se enquadram na abordagem sobre a sustentabilidade do sistema agrícola e do meio ambiente. Dentre os produtos naturais, os óleos essenciais (OEs) de origem vegetal se destacam pelo potencial de uso como aditivo alimentar, uma vez que apresentam baixa toxicidade em mamíferos e natureza efêmera, o que os torna relativamente seguros para a saúde e o meio ambiente (PRAKASH et al., 2015, 2018).

Óleos essenciais (OEs) são compostos naturais, voláteis e complexos que se caracterizam pelo forte aroma, são raramente coloridos, e são solúveis em solventes lipídicos e orgânicos, podendo ser sintetizados em diferentes partes da planta, tais como brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, encontrando-se armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (AKTHAR et al., 2014).

Os óleos essenciais são misturas de 20 a 60 componentes em concentrações diferentes, com alguns compostos em concentrações bastante elevadas (20-70%) e outros traços, constituindo-se de uma família diversificada de compostos orgânicos de baixo peso molecular (PERRICONE et al., 2015). Apresentam potencial antimicrobiano, inseticida e antioxidante, tornando-os um potencial conservante de alimentos, pela redução das reações oxidativas e das contaminações microbianas (COSTA et al., 2015; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

Os óleos essenciais podem ser obtidos por hidrodestilação, destilação a vapor, destilação seca ou por mecanismos de prensagem mecânica das plantas, sendo constituídos por misturas complexas de compostos orgânicos voláteis, como os monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, ésteres (BORN, 2012), éteres, álcoois, aldeídos e cetonas. Suas atividades biológicas e antimicrobianas estão diretamente relacionadas à presença de seus componentes voláteis bioativos (CALO et al., 2015).

Os óleos essenciais extraídos de plantas também podem apresentar atividade antimicrobiana contra bactérias (BERTINI et al., 2005). Kalembe e colaboradores (2012) apontaram a atividade de óleos essenciais contra bactérias, fungos e leveduras. Os óleos que contêm fenóis, como timol, carvacrol e eugenol, exibem

atividade mais acentuada contra esses microrganismos. Além disso, possuem baixa toxicidade aos mamíferos, são biodegradáveis, não persistentes no ambiente e apresentam baixo custo de produção (ISMAN, 2000; SILVA; BASTOS, 2007).

Segundo Houghton et al. (2007) evidenciam que não é possível afirmar que o componente majoritário presente no OE seja o que realiza a atividade fungicida ou bactericida. O efeito pode ser atribuído a um constituinte em menor proporção ou de um sinergismo entre os compostos existentes naquele material. O mecanismo da ação antimicrobiana desses óleos essenciais ainda é pouco conhecido (GONÇALVES et al., 2015). Hoyos e colaboradores (2012) afirmam que, devido à complexidade da composição dos óleos essenciais, os mecanismos de ação estão relacionados, causando mudanças e danos irreversíveis na estrutura fúngica, tais como desorganização geral e vazamento do citoplasma, ruptura da membrana plasmática e da parede celular e perda do conteúdo celular.

Vários trabalhos evidenciaram a eficiência da utilização de óleos essenciais no controle de doenças na cultura de morango. Borges et al. (2013) verificaram que o morango tratado com óleo essencial de sálvia apresentou menor incidência de fungos. Já Lorenzetti et al. (2011) observaram que os óleos essenciais de capim limão, canela e menta apresentaram efeitos sobre isolados de *Botrytis cinerea*, causador do mofo cinzento em morangueiro. Perdones e colaboradores (2012) comprovaram que revestimento de quitosana com óleo essencial de limão mostrou-se efetivo no controle de *B. cinerea* em morango. Dias-Arieira et al. (2010a) estudaram a atividade do óleo de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro na pré e pós-colheita e observaram que o óleo de eucalipto foi eficaz no tratamento *in vitro* e o de nim foi eficaz na aplicação pré-colheita. Em estudos *in vivo*, o óleo essencial de *Lippia sidoides* e *Piper aduncum* controlaram podridões ocasionadas em mangas por *Lasiodiplodia theobromae* e *Botryosphaeria dothidea* (CRUZ et al., 2012).

Desta forma, os óleos essenciais são apontados como importantes agentes antimicrobianos, apresentando potencial para utilização no controle de microrganismos na pós-colheita.

3.2.1. Óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus*

Os óleos essenciais são produzidos em cerca de 17.500 espécies aromáticas de plantas superiores pertencentes principalmente às famílias Myrtaceae, Lauraceae, Lamiaceae, e Asteraceae (REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012). Dentre as espécies da família Myrtaceae estão as do gênero *Eucalyptus*, o qual é amplamente utilizado no controle de doenças causadas por microrganismos (ISHNAVA; CHAUHAN; BARAD, 2013). Apesar de mais de 300 espécies deste gênero conter óleos voláteis em suas folhas (PINO et al., 2002), menos de vinte foram exploradas industrialmente (LU et al., 2016).

O *Eucalyptus* é um gênero nativo da Austrália, pertencente à família Myrtaceae e compreende cerca de 900 espécies e subespécies (BROOKER; KLEINIG, 1983). Este gênero é composto de espécies de múltiplos usos, como a espécie *E. staigeriana* estão relacionados à produção de óleos essenciais para a indústria alimentícia e cosmética. A espécie *E. citriodora* tem seu uso mais focado na produção de energia, construção civil e indústrias alimentícias e cosméticas. Já a espécie *E. globulus* tem uso mais aplicado nas áreas de papel e celulose, além da produção de óleos essenciais (WILCKEN et al., 2008).

Um dos principais componentes do óleo essencial de eucalipto é o 1,8-cineol, cuja quantidade depende da espécie, variando de 44% a 84%, sendo conhecido por possuir propriedades antimicrobianas (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). O *E. citriodora* possui três constituintes principais em seu óleo essencial, de cor amarela, sendo o citronelal (94.9%), acetato de citronelila (2.61%) e trans-cariofileno (2.49%). Já o *E. globulus* possui o alfa-pineno (9.93%), beta-pineno (0.88%), beta-mirceno (1.23%), 1-felandreno (0.56%), 1,8- cineol (85.84%), gama-terpineno (1.24%) e alfa-terpinoleno (0.32%) em sua constituição (CHAGAS et al., 2002). O óleo essencial de *E. staigeriana* tem como principais constituintes o 1,8-cineol (34,8%), neral (10,8%), geranial (10,8%) e α -felandreno (8,8%) (GILLES et al., 2010).

A ação fungistática do extrato das folhas de *E. staigeriana* foi observada por Ceschini (2011), o qual obteve um atraso na germinação de *Aspergillus flavus*, provocando retardamento no desenvolvimento fúngico. Segundo Martins et al. (2013), o óleo de *E. staigeriana* apresentou ação antifúngica significativa sobre *Candida albicans*. Para Silva et al. (2012), o óleo de *E. globulus*, na concentração de

0,5%, se mostrou eficiente em inibir a germinação de *Colletotrichum gloeosporioides*. Bonaldo e colaboradores (2007) evidenciaram o potencial de *E. citriodora*, na concentração 40%, na proteção de plantas no controle direto de *Sclerotium rolfsii*, *Colletotrichum sublineolum*, *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia solani* e *Alternaria alternata*, onde observou-se a inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos.

Desta forma, tendo em vista o potencial do efeito antifúngico dos OEs dessas espécies de plantas, estudos sobre seus efeitos contra fungos causadores de doenças pós-colheita em frutas de importância econômica mostram-se necessários.

3.3. Microencapsulação

Microencapsulação é o processo de elaboração de micropartículas de substâncias bioativas sólidas, líquidas ou gasosas, com o intuito de liberar seu conteúdo de maneira controlada sob condições específicas. Esta tecnologia é utilizada na indústria de cosméticos, farmacêutica e alimentícia, utilizando técnicas como: *spray drying*, *spray cooling*, coacervação, extrusão, extrusão centrífuga, recobrimento em leito fluidizado, lipossomas e complexação por inclusão (FAVARO-TRINDADE; ET AL., 2008).

A secagem por atomização utilizando *spray dryer* é o método mais comum de microencapsulação de alimentos. É uma tecnologia estabelecida e amplamente conhecida, apresentando disponibilidade de equipamentos, capacidade de produção em grande escala, variedade de encapsulados, além de ter o processo com menor custo de produção. Mesmo o equipamento utilizando altas temperaturas, a rápida evaporação mantém baixa a temperatura das gotículas, tornando a técnica possível para produtos sensíveis ao calor, como produtos biológicos, alimentícios e farmacêuticos, sem afetar do produto (DELFINI, 2016).

A microencapsulação por *spray dryer* envolve várias etapas, em que a primeira é a dispersão do material de recheio na solução contendo o material de parede para formação da emulsão, que deve ser estável durante a secagem por atomização. Em seguida, a emulsão é bombeada até o atomizador dentro da câmara de secagem com ar quente. O uso do atomizador tem como objetivo produzir a maior superfície possível de transferência de calor entre o ar e a emulsão, otimizando a transferência de massa e calor. Assim, na câmara, ocorre a secagem das partículas e a formação

do pó, onde o calor é transferido do ar para o produto devido à diferença de temperatura, e a transferência de água ocorre do produto para o ar, devido à diferença na pressão de vapor. A secagem do produto ocorre em três etapas: após o contato entre o ar e o líquido, a transferência de calor resulta no abaixamento da temperatura da partícula até valor constante, juntamente com a evaporação da água, que ocorre em temperatura constante e em pressão de vapor de água parcial. A taxa de difusão de água do núcleo até a superfície da partícula é constante e igual à taxa de evaporação na superfície. Por fim, a água da partícula atinge um valor crítico e uma película seca é formada na superfície da partícula, onde a taxa de secagem diminui rapidamente, tornando-se dependente da taxa de difusão de água através da casca formada. A secagem chega ao fim quando o ar e a partícula atingem a mesma temperatura (DELFINI, 2016; GHARSALLAOUI et al., 2007)

Neste contexto, a goma arábica tem sido utilizada para a microencapsulação de óleos por *spray drying*, pois apresenta baixa viscosidade em solução aquosa, boa capacidade emulsificante, o que favorece a estabilidade das emulsões, boa retenção de compostos voláteis e conferindo proteção efetiva contra a oxidação (ABURTO; TAVARES; MARTUCCI, [s.d.]).

Neste contexto, a microencapsulação é alternativa eficiente para aumentar a vida útil dos produtos, em que as vantagens incluem a maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, padronização do produto, maior concentração e retenção de compostos ativos e elevada capacidade de transformação (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010), no que diz respeito à utilização de diferentes materiais de parede e utilização de produtos naturais antifúngicos, como os óleos essenciais.

Estudos demonstraram as capacidades antimicrobianas e de manutenção da qualidade de frutas e hortaliças por meio da microencapsulação de compostos bioativos. Em morangos, a aplicação de micropartículas de quitosana contendo óleos de tomilho e alecrim atrasou o aparecimento da degradação na superfície da fruta e manteve boa aceitação sensorial (ALIKHANI; DARAEI GARMAKHANY, 2012). Pesquisa com nanopartículas de goma de cajueiro carregada com óleo essencial de *E. staigeriana* comprovou a eficiência da encapsulação do óleo e do poder antimicrobiano do produto (HERCULANO et al., 2015).

Ainda são reduzidos os estudos sobre microencapsulação de óleos essenciais, onde a maioria é focada na atividade antimicrobiana de bactérias patogênicas,

sendo reduzidas as pesquisas com fungos deteriorantes em pós-colheita de frutas, revelando a necessidade de pesquisas sobre o assunto.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Local

O projeto foi conduzido no Laboratório de Frutas e Hortaliças e no Laboratório de Micotoxinas e Micologia, ambos do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP, em Piracicaba, SP e no Centro de Tecnologia de Cereais e Chocolates, do Instituto de Tecnologia de Alimentos, em Campinas, SP.

4.2. Obtenção dos óleos essenciais de *E. staigeriana*, *E. citriodora*, *E. globulus*

Os óleos essenciais (OEs) de *E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus* foram obtidos comercialmente (Figura 1), pela Destilaria Bauru, sediada em Catanduva, SP, extraídos das folhas por arraste a vapor. Segundo informações do fabricante, as especificações dos produtos estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Especificações dos óleos essenciais de *Eucalyptus. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus*.

Características	<i>E. staigeriana</i>	<i>E. citriodora</i>	<i>E. globulus</i>
Aparência	Líquido levemente amarelado	Líquido límpido a amarelo claro	Líquido incolor a levemente amarelado
Odor	Característico	Característico	Característico
Densidade (a 20°C)	0,876	0,870	0,913
Principais componentes	Citral 22 a 28%	Citronelal 70 a 85%	Cineol 85%

Figura 1. Óleos essenciais de três espécies de *Eucalyptus* obtidos comercialmente.

4.3. Obtenção e identificação molecular do isolado fúngico

O isolado de *Rhizopus stolonifer* foi cedido pelo laboratório de Epidemiologia do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, da ESALQ/USP, o qual foi obtido a partir de isolamento direto de estruturas fúngicas de morangos infectados, coletados em lavoura comercial de cultivo convencional, localizado no município de Jarinu, SP. Para isso, estruturas fúngicas ou esporos presentes nas frutas coletadas foram retirados e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), com auxílio de microscópio estereoscópio. O isolado foi mantido em câmaras de crescimento tipo B.O.D. sob fotoperíodo de 12 horas a 25°C.

A identificação do fungo foi realizada no Instituto Biológico de São Paulo (São Paulo, SP). Para tanto, foram utilizadas tecnologias moleculares, como a extração e multiplicação do DNA pela técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR) e sequenciamento gênico.

O DNA foi extraído conforme método do CTAB descrito por Doyle (1987). A região do gene ribossomal 28S foi amplificada por PCR utilizando o iniciador LR0R (5' – ACCCGCTGAACTTAAGC – 3') e LR5 (5' – TCCTGAGGGAACTTCG – 3') (VILGALYS; HESTER, 1990). Os produtos amplificados por esses primers forneceram um fragmento de 900 pb. O produto purificado foi sequenciado e comparado com sequências de DNA de *R. stolonifer* depositadas no GenBank: EU6222 *Rhizopus stolonifer* isolate NW643, AF117935 *Rhizopus stolonifer* ATCC 14037 e AF117936 *Rhizopus stolonifer* ATCC 6227. O fungo foi cultivado em BDA e mantido a 25°C durante três dias, sob luz fluorescente constante, para promover o crescimento micelial e a esporulação.

O patógeno foi identificado como a espécie *Rhizopus stolonifer* e o sequenciamento de DNA obtido pode ser observado a seguir:

ATGATTTCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGAGGAAAGAGCTCAAAGTTGGAACCTG
 TTTGTGCCTAGCTAAACAGGATTGTAACTGTAGAAGTGTTTTCCAGGCAATCCG
 AGTTAATAAGTCCTTTGGAACAGGGCATCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTTG
 ATTCGAGATATTTTGTCTTTTGCGATACACTTTCAAAGAGTCAGGTTGTTTGGGA
 ATGCAGCCTAAATTGGGTGGTAAATCTCACCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAAA
 CCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAG
 TTAACAGTATGTGAAATTGTAAAAGGGAACCGTTTGGAGCCAGACTGGCTTG
 TCTGTAATCAATCTAGGTTTCGTGCCTGGATGCACTTGCAGACTATTTGCCTGCC
 AACGACAATTTTTTTTTGAGTGTAAAACTATTGGAAATGTGGCCAATATTTATTTA
 TTGGTGTTATAGTCCTTTAGAAAATACCTTGAATTGGATTGAGGAACGCAGCGAA
 TGCTTCTCTTTTGAAGCAAAGTCTTTTATTGGGATTTACGGATCAGACTGTGGCA
 TTGTCACAAGACTTGAAGTTTAAACCTATTTTTGAACTTTTATTGCTTAGGTTGT
 TGGCTTAATGACTCTAAATGACCCGTCTTGAACACGGACCAAGGAGTCCACCA
 TTAGTGCGAGTATTTGGGTGCCAAACCCATATGCGCAAGGAACTGAATGATAT
 GAATCCATTTAGGAGGCAAT.

4.4. Armazenamento do fungo

Com o intuito de manter a patogenicidade do fungo identificado, foi necessário inocular e isolar o fungo de frutos sintomáticos com frequência.

O método de preservação dessa espécie fúngica foi empregado utilizou papel filtro, que permite a conservação do isolado em congelamento. Nesse método, a espécie fúngica foi repicada por solução de esporos ou por alíquota de micélio, em placas de Petri contendo meio BDA solidificado, contendo discos de papel filtro esterilizados sobre ele. Após a colonização do fungo na superfície dos discos de papel filtro, estes foram transferidos com o auxílio de uma pinça para placas de Petri esterilizadas, as quais foram mantidas em temperatura ambiente até que os fragmentos de papel filtro contendo o micélio ficassem completamente secos. Posteriormente, esses discos foram depositados em microtubos tipo “Eppendorf” com dessecante de sílica gel, fechados e vedados com filme de PVC. Os microtubos foram identificados com a espécie fúngica e armazenados sob congelamento a -18°C (SMITH; ONIONS, 1994). Para reativar a cultura, o disco de papel foi colocado em placa de Petri com meio BDA e incubado em BOD a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Essas etapas foram repetidas à medida que os fungos eram utilizados nos ensaios.

4.5. Encapsulação dos óleos essenciais (OEs)

A encapsulação dos OEs de *E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus* foi realizada no Centro de Tecnologia de Cereais e Chocolates, do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), localizado em Campinas, SP. Utilizou-se goma arábica Encapsia®, da empresa Nexira, como material de parede para a confecção das partículas. Foram realizadas duas séries de processos (outubro de 2017 e abril de 2018) utilizando a formulação padrão e os óleos essenciais (Tabela 2).

Em ambas séries de processos de 2017 e 2018, foram preparadas duas formulações de cada OE para processar no *Spray Dryer*, a fim de obter quantidade de partículas (Figura 3B) suficientes para a realização de todos os ensaios. Essas formulações, referentes aos OEs, foram reunidas e geraram uma amostra de cada óleo.

Tabela 2. Formulação padrão (%) realizada para obtenção das partículas contendo óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus*.

Compostos	Quantidade (%)
Óleo essencial	5
Goma arábica 25%	20
Tween 80	0,5
Água	74,5

Para o processamento das partículas, primeiramente pesou-se a goma arábica já diluída, o Tween 80 e o restante de água, o qual foi agitado em agitador magnético de hélice por 10 minutos. A seguir, o óleo essencial foi adicionado, sendo a mistura homogeneizada em Ultra-turrax a 11000 rpm por 5 minutos (Figura 2).

Durante o processamento das partículas em *Spray Dryer*, a estabilidade de cada emulsão foi acompanhada visualmente por monitoramento de 10 ml da emulsão adicionada a uma proveta.

Figura 2. Homogeneização da amostra para encapsulação dos óleos essenciais de *Eucalyptus staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus* em agitador magnético (à esquerda) e ultra-turrax (à direita).

A secagem por atomização foi feita utilizando-se um secador laboratorial com sistema de atomização duplo fluido com 0,7 mm de diâmetro (mini *spray dryer*, marca Büchi, modelo B-290) (Figura 3A). A alimentação do secador foi realizada através de uma bomba peristáltica configurada para trabalhar em 30% de sua rotação máxima, temperatura de entrada de $140 \pm 2^\circ\text{C}$, temperatura de saída de $75 \pm 2^\circ\text{C}$, aspiração estabelecida em 95%, pressão de atomização de 0,75 bar limpeza do bico definida em zero.

Figura 3. Processamento da formulação para encapsulação dos óleos essenciais de *Eucalyptus staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus* em equipamento *Spray Dryer* (A) e a partícula obtida (B).

4.5.1. Caracterização das micropartículas

A caracterização das micropartículas contendo OEs de eucalipto foi realizada por meio das análises de eficiência de encapsulação, atividade de água, umidade, tamanho das partículas, microscopia eletrônica de varredura e composição química dos OEs encapsulados.

- Eficiência de Encapsulação (óleo total e superficial)

O conteúdo de óleo total do produto encapsulado foi determinado por hidrodestilação de 10 g do material microencapsulado e água destilada (100 mL), por 3 horas, em um destilador tipo Clevenger (Figura 4), obtendo-se a massa do óleo essencial.

A quantidade de óleo superficial foi determinada pelo método descrito por Bae e Lee (2008) com adaptações. Cinco gramas da partícula de cada OE foram depositados em papel filtro Whatman N° 40, contido em funil de vidro apoiado em becker de vidro. As partículas foram lavadas cinco vezes usando 10 mL de hexano por vez, totalizando 50 mL de hexano. Após a filtração, foi realizada a evaporação

do solvente em estufa a 50°C, até peso constante. A quantidade de óleo superficial foi determinada pela diferença de massa antes e depois da extração com hexano.

Figura 4. Análise do teor de óleo total das partículas para encapsulação dos óleos essenciais de *Eucalyptus staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus* através do método de destilação tipo Clevenger.

A partir destes resultados foi calculada a eficiência de encapsulação a partir da equação:

$$EE (\%) = \frac{OT - OS}{OT} \times 100$$

Em que EE é a eficiência de encapsulação (%); OT é a quantidade de óleo total (gramas) e OS é a quantidade de óleo superficial (gramas).

- Tamanho das partículas

O tamanho médio e a distribuição de tamanho das micropartículas foram determinados em Laser Light Scattering Analyzer LA-900 (Horiba Instruments) com a dispersão das amostras em álcool etílico absoluto (mínimo de 95% de etanol). A quantidade de amostra foi ajustada a um nível adequado de refração para se obter leitura no equipamento.

- Umidade

O conteúdo de umidade das partículas foi determinado em balança determinadora de umidade (marca Bel), à temperatura de 70°C.

- Atividade de água

A atividade de água foi verificada em higrômetro digital (marca TESTO) a 25°C, em triplicata.

- Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise de microscopia eletrônica de varredura foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Rosemberg e Young (1993). Como preparação das amostras, foi feita uma raspagem manual nas amostras, secas até o ponto crítico Leica (modelo EM CPD300, marca Wetzlar) por imersão de fragmentos em dióxido de carbono líquido e fixadas em porta-espécimes metálicos (*stubs*), de 12 mm de diâmetro e 10 mm de altura (Figura 5B), através do uso de uma fita adesiva dupla face. As amostras foram recobertas, utilizando-se o processo de evaporação de ouro em vácuo em aparelho metalizador (Marca Baltec, modelo SCD 050) durante 3 minutos. As amostras metalizadas foram mantidas em um suporte fechado, dentro de um dessecador, até o momento da observação ao microscópio eletrônico de varredura LEO 435 (Marca Zeiss) (Figura 5A). A avaliação das imagens foram realizadas pelo LEO software.

Figura 5. Microscópio eletrônico de varredura LEO435 (A) utilizado para análise das partículas contendo óleos essenciais de *Eucalyptus staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus* e *Stubs* com amostras (B).

4.6. Composição química dos OEs livres e das partículas contendo OE de *E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus*

A composição química foi determinada para os OEs de *E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus* e para as partículas contendo os três OEs utilizados. Para a realização do procedimento para análise das partículas, foi utilizado o OE obtido da metodologia de Eficiência de Encapsulação (EE) (item 4.5.1).

A caracterização foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, utilizando um equipamento CGMS 2010 (SHIMADZU), equipado com detector de massas QP 2010 Plus (SHIMADZU) e coluna cromatográfica capilar Difenil Dimetilpolissiloxano (5% diphenyl e 95% dimethylpolysiloxane). A programação de temperatura para o forno foi: 50°C por 1,5 min, elevada a 4°C min⁻¹ até 200°C, e então elevada a 10°C min⁻¹ até 240°C, permanecendo nesta temperatura por 7 min. A temperatura do injetor foi de 240°C e 220°C para fonte de íons e interface. A injeção foi feita no modo “Split”, o volume de amostra injetado foi de 1 µL para os OEs e a razão do “Split” foi de 1:2. O Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 1,2 mL min⁻¹. O detector de massas foi operado no modo *scan* com faixa de varredura de 40 a 500 m/z.

Os compostos voláteis foram identificados por meio da avaliação do Índice de Retenção Linear (IRL), sendo uma ferramenta auxiliar usual na identificação de compostos, especialmente no campo de óleos essenciais em que normalmente são formados por diversos elementos. O IRL foi calculado para cada substância, e os resultados foram comparados com dados publicados na literatura (ADAMS, 2007) e com as bibliotecas de espectros de massas existentes (NIST, WebBook, NIST 07 e WILEY 8). Foram identificados apenas os picos com presença maior que 0,5% da área total do cromatograma.

O IRL foi utilizado quando a corrida cromatográfica teve programação linear de temperatura, e calculado a partir da equação:

$$IRL = 100n + 100 \frac{tr(i) - tR(n)}{tR(n+1) - tR(n)}$$

Em que: IRL = Índice de Retenção Linear; t = tempo de retenção; i = analito; n = número de carbonos do padrão adjacente menos retido; n+1 = número de carbonos do padrão adjacente mais retido.

4.7. Avaliação da eficiência *in vitro* dos óleos essenciais sobre o *Rhizopus stolonifer*

O objetivo deste experimento foi avaliar a capacidade antifúngica de cada OE e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre o fungo *Rhizopus stolonifer*. A atividade antifúngica dos OEs foi avaliada mensurando-se a restrição ao crescimento de cada fungo por contato direto com o meio de cultura BDA contendo o OE (PLAZA et al., 2015) e por volatilização, seguindo a metodologia de Yun et al. (2013) em meio de cultura BDA.

4.7.1. Eficiência *in vitro* por contato dos óleos essenciais (OEs) livres

As concentrações dos OEs avaliadas nesta etapa foram definidas a partir dos resultados obtidos em pré-testes. O delineamento experimental adotado foi casualizado, sendo utilizadas quatro concentrações para os OEs de *E. staigeriana* e *E. citriodora* e cinco, para o OE de *E. globulus*. Foram utilizadas cinco repetições em cada tratamento, sendo a parcela experimental representada por uma placa de Petri.

Inicialmente, os OEs foram quantificados de acordo com as concentrações (ppm) previamente definidas, em microtubos esterilizados (Figura 6A), nos quais foi adicionado o emulsificante Tween 20, na proporção 2:1 v/v. A mistura foi homogeneizada em agitador tipo Vórtex durante 1 minuto e deixada em repouso até o momento da sua utilização. Previamente à transferência do meio de cultura para as placas, a concentração do óleo a ser avaliada foi misturada ao meio de cultura fundido e homogeneizado em Erlenmeyer (Figura 6B). Foram adicionados 20 mL de meio de cultura BDA em placas de Petri descartáveis com 8,6 cm de diâmetro (Figura 6C). Após a solidificação do meio, foi feito um furo com uma haste metálica e 10 µL do fungo foram depositados no centro da placa, a partir de uma suspensão de esporos contendo 10^5 esporos.mL⁻¹. As placas foram vedadas com filme plástico tipo PVC e mantidas em câmaras de crescimento tipo B.O.D., sob fotoperíodo de 12 horas, a 25°C.

Figura 6. Óleo essencial e emulsificante tween 20 (A), adição do OE + Tween 20 em meio de cultura fundido (B), meio BDA vertido em placa de Petri (C).

O controle e os tratamentos com Tween 20 acrescidos no experimento correspondem respectivamente às placas de Petri contendo somente meio de cultura BDA, e placas de Petri contendo meio de cultura BDA adicionado do emulsificante Tween 20 nas concentrações utilizadas para cada dose de cada óleo.

O inóculo fúngico foi preparado a partir de colônias do fungo desenvolvidas em meio de cultura BDA. A suspensão do inóculo foi obtida pela raspagem da superfície do crescimento das colônias, com uma pinça, e imersão destas em um béquer contendo 50 mL de água estéril. Ao béquer contendo água foram adicionados 500 μ L do emulsificante dimetil sulfóxido (DMSO) para auxiliar na distribuição dos esporos na solução aquosa. A concentração de esporos na suspensão foi avaliada por meio da contagem em câmara de Neubauer, visualizada em microscópio. A concentração de esporos foi padronizada para 1 a 9×10^5 esporos mL^{-1} .

As medições do crescimento fúngico foram realizadas a cada 12 horas de incubação, até o momento em que o patógeno do tratamento controle atingiu toda a extensão da placa de Petri, ou seja, quando o fungo alcançou seu máximo crescimento na unidade experimental (8,6 cm). A partir deste momento, as leituras do crescimento fúngico foram realizadas a cada 7 dias, até o 21º dia após a incubação. Para isto, o diâmetro do crescimento da colônia foi medido em duas direções em ângulo de 90°, utilizando paquímetro digital. A média aritmética das duas medidas foi considerada representativa do diâmetro do crescimento da colônia.

A inibição que as diferentes concentrações do OE proporcionaram no fungo foi medida comparando-se a área do crescimento do fungo no controle com a área do crescimento fúngico nos demais tratamentos (concentrações em ppm). O resultado foi obtido em porcentagem de inibição (PI) e calculado pela fórmula:

$$PI (\%) = \frac{(\text{Crescimento do controle} - \text{Crescimento do tratamento})}{\text{Crescimento do controle}} \times 100$$

A partir dos dados referentes à PI (%), foi possível verificar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do experimento, a qual foi considerada como a menor concentração do OE em que houver inibição de 100% do crescimento micelial de *Rhizopus stolonifer*. Para a análise da CIM utilizou-se a PI (%) calculada no último período de medição, onde havia o máximo crescimento fúngico do controle. Para a validação dos dados, o experimento foi realizado em três repetições.

4.7.2. Eficiência *in vitro* por exposição aos voláteis dos OEs livres

As concentrações de OE avaliadas nesta etapa foram definidas a partir dos resultados obtidos em pré-testes. O delineamento experimental adotado foi o casualizado, sendo realizado com cinco concentrações para os OEs de *E. staigeriana* e *E. citriodora* e seis concentrações para o OE de *E. globulus*. Foram utilizadas cinco repetições em cada tratamento, sendo a parcela experimental representada por uma placa de Petri.

A atividade antifúngica dos OEs e a CIM também foram avaliadas pelo método de exposição aos voláteis. Os OEs foram quantificados em microtubos esterilizados, os quais foram emulsionados em tween 20 (na proporção 2:1 v/v), homogeneizados em agitador tipo vórtex durante 1 minuto e vertidos em placas de Petri, sobre um círculo de papel filtro fixado na tampa da placa com fita dupla face. A seguir, foram adicionados 20 mL de meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) em placas de Petri. Após a solidificação do meio, foi feito um furo com uma haste metálica e 10 µL do fungo foi inoculado no centro da placa, a partir de uma suspensão de esporos contendo 10⁵ esporos mL⁻¹. As placas foram vedadas com filme plástico tipo PVC e mantidas em câmaras de crescimento tipo B.O.D. sob fotoperíodo de 12 horas a 25°C.

A forma de incubação das placas, mensuração do crescimento micelial e determinação da CIM foram as mesmas descritas no método por contato (item 4.7.1).

4.7.3. Eficiência *in vitro* por exposição aos voláteis das partículas contendo OEs

As concentrações das partículas de OE avaliadas nesta etapa foram definidas a partir dos resultados obtidos em pré-testes. O delineamento experimental adotado foi o casualizado, sendo realizado com 5, 6 e 7 concentrações para as esferas de *E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus*, respectivamente. Foram utilizadas cinco repetições em cada tratamento, sendo cada parcela experimental representada por uma placa de Petri.

A atividade antifúngica das partículas e a CIM foram avaliadas pelo método de exposição aos voláteis, em que o produto microencapsulado foi pesado baseado na concentração desejada. A seguir, com o auxílio de fita dupla face, as partículas foram inseridas na tampa de placas de Petri descartáveis com 86 mm de diâmetro, onde foram adicionados 20 ml de meio de cultura BDA. Após a solidificação do meio, foi feito um furo com uma haste metálica e 10µl do fungo foram depositados no centro da placa, a partir de uma suspensão de esporos contendo 10^5 esporos mL⁻¹. As placas foram vedadas com filme plástico tipo PVC e mantidas em câmaras de crescimento tipo B.O.D., sob fotoperíodo de 12 horas, a 25°C.

A forma de incubação das placas, mensuração do crescimento micelial e determinação da CIM foram as mesmas descritas no método por contato (item 4.7.1).

Ao final deste experimento, as partículas que obtiveram a melhor capacidade de inibição do *Rhizopus stolonifer*, foram selecionadas para a etapa do experimento *in vivo*.

4.8. Avaliação da eficiência *in vivo* das partículas sobre *Rhizopus stolonifer*

O objetivo deste experimento foi avaliar a eficiência *in vivo* das partículas de *E. staigeriana* e *E. citriodora*, as quais apresentaram os melhores desempenhos antifúngicos nos experimentos *in vitro*.

Este experimento foi realizado duas vezes, em julho de 2018. Para a execução da etapa de avaliação *in vivo* da eficiência das partículas de OE sobre *R. stolonifer*, morangos de cultivo orgânico da variedade Oso Grande foram coletados no município de Cambuí, MG (Figura 7) e transportados até o Laboratório de Frutas e

Hortaliça, do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP.

Figura 7. Morangos orgânicos de cultivo protegido (Cambuí, MG) utilizados nos experimentos.

O delineamento experimental adotado nesta etapa foi esquema fatorial 3x4, sendo 3 tratamentos e 4 períodos de avaliação (1° ao 7° dias de armazenamento), com oito repetições por cada tratamento, sendo 6 morangos para cada repetição, em cada período de avaliação.

Os tratamentos utilizados foram:

C: Morangos sem adição de óleos essenciais e partículas de óleos encapsuladas (Controle);

OE: Morangos com adição de óleo essencial;

P: Morangos com adição de partículas microencapsuladas.

Previamente à aplicação dos tratamentos, os morangos foram selecionados visualmente quanto à dimensão, cor, aparência e sanidade; sendo em seguida lavados em água corrente para a retirada de sujidades. A higienização foi realizada por meio da imersão dos frutos em solução de cloro a 2,5% durante 2 minutos.

Foram confeccionados sachês com as formulações de micropartículas (Figura 8A), de acordo com metodologia adaptada de Alikhani et al. (2012), em que as partículas foram pesadas e colocadas em bolsas do material TNT (4x5 cm), e posteriormente perfuradas uniformemente com agulha de insulina de 0,25 mm de diâmetro. A eficiência das partículas contendo OEs foi testada por meio desses sachês, os quais foram dispostos nas tampas das embalagens de PVC sem contato direto com as frutas. As embalagens apresentavam orifícios e tinham capacidade para 6 morangos (Figura 8B).

Figura 8. Sachês com as partículas contendo os OEs de *E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus* (A) e embalagem utilizada para acondicionamento dos morangos (B).

As embalagens com os morangos foram separadas em três lotes: controle (C) não contendo nenhum tratamento; tratamento óleo essencial (OE), em que foi adicionado OE em papéis filtro Whatman N° 40; tratamento com a partícula (P), onde foram utilizados os sachês confeccionados.

Em seguida, foi realizado o acondicionamento dos morangos na embalagem, o fungo *R. stolonifer* foi inoculado por deposição de 10 μL de suspensão de inóculo contendo 10^5 esporos mL^{-1} sobre um ferimento de 3 mm nos morangos, feito com agulha de insulina de 0,25 mm de diâmetro. Por fim, os morangos embalados foram dispostos em bandejas plásticas maiores para o armazenamento em câmara de crescimento B.O.D. a 25°C.

A eficiência antifúngica dos tratamentos foi avaliada a cada 12 horas pela Severidade e Incidência da Doença (ID) nos frutos inoculados, sendo descartados aqueles que apresentavam alto grau de deterioração ou contaminação por outros microrganismos. A Severidade foi avaliada por meio de uma escala de notas de seis níveis (0 = ausência de sintomas; 1 = 1% a 20% de área lesionada; 2 = 21% a 40%; 3 = 41% a 60%; 4 = 61% a 80% e 5 = mais de 81% da área lesionada) (Figura 9) (Oliveira, 2019).

Figura 9. O índice de doença foi avaliado por meio de uma escala de notas de seis níveis. Foto: (OLIVEIRA, 2019).

A partir dessas notas foi calculado, de acordo com Cia et al. (2010), o Índice de Doença (ID) de cada período de avaliação:

$$ID(\%) = \frac{[(1 \times n1) + (2 \times n2) + (3 \times n3) + (4 \times n4) + (5 \times n5)] \times 100}{5 \times N}$$

Em que: ni é o número de frutas infectadas na respectiva escala de notas e N é o número total de frutas.

A partir do ID (%) foi calculada, para cada tratamento, a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), conforme a equação apresentada por Campbell e Madden (1990):

$$AACPD = \sum \left[\frac{(y_i + y_{i+1})}{2 \times (t_{i+1} - t_i)} \right]$$

Em que: yi= ID no tempo ti; yi+1 = ID no tempo; ti = tempo inicial da leitura e ti+1 = tempo em dias de cada leitura.

A incidência da doença foi calculada a partir do número de frutas sintomáticas em relação ao número total de frutas em cada tratamento, sendo os resultados expressos em porcentagem (ALI; WEE PHENG; MUSTAFA, 2015). Essa observação foi feita três dias após a inoculação do fungo.

Os resultados do experimento *in vivo* foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para o Teste F em blocos randomizados, os quais correspondiam aos dois experimentos *in vivo*. As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% (p<0,05) de nível de significância, pelo software estatístico Statistical Analysis System modelo 9.4. (SAS/QC Software).

Ao final deste experimento, as partículas que obtiveram a melhor capacidade de inibição do *Rhizopus stolonifer*, foram selecionadas para a etapa da avaliação da qualidade físico-química e sensorial.

4.9. Avaliação da qualidade físico-química e sensorial de morangos tratados com partícula contendo *E. citriodora*.

O objetivo deste experimento foi avaliar a qualidade físico-química e sensorial dos morangos sob refrigeração, juntamente com as partículas de *E. citriodora*,

espécie de óleo que apresentou o melhor desempenho antifúngico nos experimentos *in vivo*.

Os morangos foram obtidos de cultivo orgânico, no município de Cambuí, MG, transportados ao Laboratório de Frutas e Hortaliças (Piracicaba, SP). As frutas foram selecionadas visualmente quanto à dimensão, cor (vermelho), aparência e sanidade. A higienização foi realizada por meio da imersão das frutas em recipiente plástico com capacidade para 5 L contendo solução de cloro a 2,5% durante 2 minutos, e deixados secar em temperatura ambiente.

Após, as frutas foram separadas em três lotes, os quais correspondiam ao controle (C), sem nenhum tratamento; tratamento com óleo essencial (OE), no qual foi adicionado OE em papéis filtro (Whatman N°40); tratamento com a partícula (P), onde foram utilizados os sachês confeccionados (Item 4.7).

Após a secagem em temperatura ambiente, as frutas foram acondicionadas em embalagens vazadas de polietileno transparente com tampa articulada (Figura 10), com capacidade de 250 g de morango, e armazenadas a $5,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa média de 60% em câmara de refrigeração, durante 18 dias. A temperatura e a umidade relativa foram controladas com termo higrômetro digital durante todo o período de armazenamento.

As avaliações foram realizadas a cada três dias de armazenamento, sendo a primeira realizada no dia um após o processamento, até 18 dias de armazenamento, compreendendo sete períodos de análises (1, 3, 6, 9, 12, 15 e 18 dias). Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, compostas de 250g de fruta cada repetição. Dessa forma, o delineamento experimental neste experimento foi esquema fatorial 4 x 7, envolvendo três tratamentos (C, OE e P) e 7 períodos de avaliação (1, 3, 6, 9, 12, 15 e 18 dias).

Figura 10. Acondicionamento de morangos (sem nenhum tratamento, tratamento OE livre de *E. citriodora* e tratamento partícula encapsulada com OE de *E. citriodora*) em embalagens de polietileno para avaliação da sua qualidade físico-química e sensorial.

4.9.1. Análises físico-químicas

As análises de perda de massa fresca, Índice de ocorrência de doenças no pericarpo, degradação por fungos, cor e firmeza foram realizadas conforme segue:

- Perda de massa fresca: determinada por diferença, em percentual, entre as massas inicial e final de quatro repetições por tratamento;
- Índice da ocorrência de doenças no pericarpo: realizada visualmente e classificada de acordo com a área da superfície dos frutos com sintomas de crescimento microbiano. Foi utilizada a escala de notas, onde: “Nota 0” = nenhum crescimento microbiano na superfície dos morangos; “Nota 1” = índice “Leve” (<25% da área da superfície com sintomas); “Nota 2” = “Moderado” (26 a 50% da área da superfície com sintomas) e “Nota 3” = índice “Grave” (≥50% da área da superfície com sintomas) (WALL et al., 2011).
- Degradação por fungos: os morangos que mostraram qualquer sinal de desenvolvimento micelial na superfície foram considerados deteriorados. Os resultados foram expressos como percentagem de morangos infectados (PERDONES et al., 2012).

- Cor: os valores Luminosidade (L^*), ângulo de cor Hue (tonalidade da cor em graus), e Cromaticidade (saturação da cor) foram medidos pelo colorímetro Chroma Meter CR-400 de 8 mm de diâmetro e iluminante padrão CIE C (Konica Minolta Sensing, Tokyo, Japão). O aparelho foi calibrado em superfície branca utilizando o iluminante padrão CIE C (CIELAB). Para a avaliação da cor foram utilizadas dez frutas de cada tratamento, com leituras em lados opostos de cada uma;
- Firmeza: determinada a partir de penetrômetro (Instrutherm, PTR-300), ponteira de 3 mm (AOAC, 2005). Foram avaliados dez frutos por repetição, sendo os resultados expressos em Newtons (N);
- pH: determinado segundo método nº 981.12 da AOAC (2005);
- Teor de sólidos solúveis (TSS): quantificado segundo método 932.12 da AOAC (2005), com resultados expressos em °Brix.
- Acidez titulável (AT): determinada e calculada segundo método nº 942.15 da AOAC (2005). Os resultados foram expressos em mg de ácido cítrico g^{-1} morango.

Para a realização das análises pH, Teor de Sólidos Solúveis (TSS) e Acidez Titulável (AT), as frutas foram trituradas em mixer doméstico (Wallita) e filtradas em gaze.

- Ratio (índice de maturação): calculado por meio da relação entre o TSS e AT;
- Antocianinas totais monoméricas: determinadas a partir da técnica de diferença de pH, de acordo com o método nº 2005.02 da AOAC (2005). Os resultados foram expressos em mg de equivalente cianidina 3-glicosídeo 100 g^{-1} de morango;
- Compostos fenólicos totais (CF): análise realizada de acordo com Singleton (1985), com a utilização dos reagentes Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio e leituras a 740 nm em espectrofotômetro (JKI UVS-752N). Foi realizada uma curva padrão de ácido gálico, sendo os resultados expressos em mg equivalentes ácido gálico g^{-1} de morangos.

Para a determinação de Antocianinas Totais Monoméricas e de Compostos Fenólicos Totais, um extrato de morango foi preparado a partir da homogeneização de 6g de fruta triturada em 20mL de acetona 80% (PETRICCIONE et al., 2015), após 24 horas a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ a mistura foi centrifugada (95000 g por 12 min a 4°C). O sobrenadante foi retirado e mantido sob congelamento (-18°C) até o momento de análise.

Os dados obtidos das análises físico-químicas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para o Teste F. As médias foram comparadas pelo Teste de

Tukey a 5% ($p < 0,05$), utilizando-se o software estatístico Statistical Analysis System modelo 9.4. (SAS/QC software/2013).

4.9.2. Análise sensorial: teste de diferença de controle

O experimento, previamente à análise sensorial, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da ESALQ/USP, tendo obtido o Certificado de Apreciação Ética número 55100316.8.0000.5395, o qual está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Brasil). As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (ESALQ/USP) em duas sessões, que ocorreram após seis e treze dias de armazenamento refrigerado dos morangos.

A equipe sensorial era formada por 23 provadores, para o primeiro período e 22 provadores, para o segundo período, não treinados de ambos os sexos, sendo 79% do sexo feminino, com faixa etária entre 18 e 25 anos na maioria.

Empregou-se o Teste de Diferença do Controle (MEILGAARD; CARR; CIVILLE, 1999), que tem como objetivo verificar se existe diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos de óleo essencial líquido e partícula (OE e P) e o controle (morango sem tratamento), além de estimar o grau dessa diferença. Para tanto, o teste foi realizado em cabines individuais, com a utilização de luz branca e durante o dia, sendo as amostras de morango dispostas em pratos de porcelana brancos.

Os provadores receberam uma amostra padrão, identificada com a letra P, correspondente ao controle, e três amostras codificadas com algarismos de três dígitos (C, OE e P). Após, eles foram instruídos a comparar as amostras codificadas com o padrão, e a avaliar o grau de diferença entre elas usando uma escala de 11 níveis (0 = nenhuma diferença da amostra Padrão e 10 = extremamente diferente da amostra Padrão). Foram avaliados os atributos cor de morango, aroma de morango, aparência e diferença sensorial geral.

Junto ao teste, os provadores responderam questões relacionadas às suas percepções das amostras, como amostra preferida, aromas estranhos percebidos e qual amostra mais gostaram. A ficha de análise sensorial entregue aos provadores está inserida no Anexo.

Os resultados foram avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) e pelo teste de Média de Dunnett, comparando-se apenas o padrão com todas as outras amostras.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização das partículas contendo óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus*

5.1.1. Eficiência da encapsulação (EE)

A microencapsulação dos óleos essenciais de *E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus* foi realizada através de dois lotes no anos de 2017 e 2018 (Tabela 3). Dessa forma, obtendo-se quantidade de partículas suficientes para realização de todos os experimentos.

Tabela 3. Quantidade (g) de partículas encapsuladas contendo os OEs de três espécies de *Eucalyptus* produzidas por *Spray Dryer* em dois lotes (2017 e 2018) e eficiência de encapsulação (EE) (%).

Óleo essencial	Lote de 2017		Lote de 2018	
	Quantidade (g)	EE (%)	Quantidade (g)	EE (%)
<i>E. staigeriana</i>	120	62	239	97
<i>E. citriodora</i>	127	98	333	52
<i>E. globulus</i>	127	97	66	53

No lote de 2017, os valores de eficiência de encapsulação foram altos para as micropartículas avaliadas, superiores a 97%, com exceção da microcápsula contendo OE de *E. staigeriana*, que apresentou eficiência de 62%. Já no lote de 2018, a eficiência de microencapsulação foi intermediária, sendo 52 e 53% para *E. citriodora* e *E. globulus*, respectivamente e 97% para *E. staigeriana*.

Os valores encontrados são semelhantes aos encontrados em outros estudos, no entanto observou-se a variação de EE entre lotes dos mesmos óleos. Como as condições de instalação do experimento, de emulsão e de material de parede (goma arábica) foram as mesmas, essa alteração não foi causada durante o processamento das partículas. Assim, esta alteração pode estar relacionada à metodologia de quantificação dos óleos essenciais superficiais (item 4.5.1). Apesar de todos os procedimentos terem sido repetidos rigorosamente, houve utilização de aquecimento e sabe-se que os OEs são voláteis, assim a recuperação do óleo superficial é complicada por conta da volatilização durante a metodologia.

A eficiência de encapsulação de micropartículas é importante para avaliar a estabilidade do óleo encapsulado (AHN et al., 2008). Essa eficiência é influenciada pelos materiais de parede, material interno e características da emulsão, como tamanho da gota da emulsão, e o processo de secagem (JAFARI et al., 2008).

Em seus estudos, Fernandes (2009) utilizou a maltodextrina e a goma arábica em diferentes proporções para a microencapsulação de óleo essencial de alecrim-pimenta, cuja eficiência foi avaliada pela quantidade específica de óleo essencial encapsulado nas micropartículas, sendo obtido valor máximo de 65%, dependente das condições experimentais empregadas.

Delfini (2016) fez micropartículas de óleo de semente de maracujá, via *spray drying*, utilizando como material de parede a goma arábica e outros encapsulantes. Como resultados, ele encontrou que a eficiência de encapsulação para a goma variou de 71 a 89%, de acordo com o tipo de homogeneizador utilizado.

Reineccius et al. (1995) compararam a goma arábica com amidos modificados na microencapsulação de óleos essenciais, e observaram que a goma apresentou menor capacidade encapsulante, quando comparado aos demais. O maior peso molecular do material de parede resulta em menor quantidade de óleo na superfície da partícula, e assim, maior eficiência de encapsulação (PEDROZA-ISLAS; MACÍAS-BRAVO; VERNON-CARTER, 2002).

5.1.2. Tamanho de partículas

As partículas contendo os óleos essenciais, produzidas via *Spray Dryer*, foram avaliadas quanto aos seus parâmetros de tamanho. As faixas de diâmetros das amostras, considerando as distribuições acumuladas de 10 e 90% (D_{10} e D_{90}), variaram entre 4,13 μm a 62,35 μm para *E. staigeriana*, 5,21 μm a 23,21 para *E. citriodora* e 3,81 μm a 18,97 μm para *E. globulus* (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros de tamanho de micropartículas contendo óleos essenciais de *E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus* (valores médios $\pm$ DP).

Parâmetros de tamanho	<i>E. staigeriana</i>	<i>E. citriodora</i>	<i>E. globulus</i>
D_{10}^*	4,13 $\pm$ 0,04	5,21 $\pm$ 0,08	3,81 $\pm$ 0,03
D_{50}^*	14,41 $\pm$ 0,20	11,18 $\pm$ 0,36	9,24 $\pm$ 0,03
D_{90}^*	62,35 $\pm$ 15,41	23,21 $\pm$ 2,49	18,97 $\pm$ 1,01
Span**	4,03 $\pm$ 1,02	1,63 $\pm$ 0,19	1,64 $\pm$ 0,10

*Diâmetros (μm) referentes à distribuição acumulada de 10, 50 e 90% das partículas.

** Índice de polidispersidade ($D_{90} - D_{10} / D_{50}$). D_{50} refere-se ao diâmetro médio.

O parâmetro de tamanho D_{50} é o diâmetro de partícula correspondente a porcentagem acumulada de 50% dos valores medidos, sendo considerado, portanto o diâmetro médio da amostra. Nas micropartículas produzidas os valores de D_{50}

obtidos foram de 14,41 μm , 11,18 μm e 9,24 μm para as partículas de *E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus*, respectivamente.

Carvalho (2013), em seu trabalho sobre microencapsulação de óleo de café verde encontrou faixa de tamanho de microesferas entre 14,51 a 19,50 μm , para emulsões estabilizadas por lecitina-quitosana e 16,40 a 29,19 μm , para emulsões estabilizadas por lecitina.

Ribeiro e colaboradores (2014) em estudo de avaliação de estrutura mista de proteção para microencapsulação de ômega-3, encontrou valores de D_{50} entre 4,92 e 12,38 μm . Esses tamanhos são considerados convencionais, quando processados pelo atomizador mini Spray Dryer (Büchi, modelo B-290). O diâmetro médio pode ser influenciado por fatores como as propriedades físicas das emulsões e variáveis de processo.

Silva (2013) em estudo sobre a microencapsulação de extrato de pequi encontrou uma grande variação de tamanhos, onde o pico foi entre 8 e 20 μm , além de picos menores variando entre 1 μm até 200 μm .

Os valores encontrados nesta pesquisa estão próximos aos estudos anteriores, evidenciando que as partículas produzidas com óleo essencial apresentam tamanho de partículas semelhante a outros óleos microencapsulados.

Para o índice de polidispersidade, foram obtidos os valores de 4,03 μm , 1,63 μm e 1,64 μm para as partículas de *E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus*, respectivamente. Os valores encontrados para *E. staigeriana* evidenciam que houve uma maior variação de tamanho das partículas, provavelmente devido a instabilidade da emulsão no momento da atomização ou a fenômenos de aglomeração logo após a secagem.

■ *E. staigeriana*; ■ *E. citriodora*; ■ *E. globulus*.
Figura 11. Distribuições de tamanho de partículas de amostras contendo óleos essenciais de *Eucalyptus staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus*.

Pode-se observar nas distribuições de tamanho de partículas das amostras contendo os óleos essenciais (Figura 11), que em todos os casos houve a formação de uma porcentagem de partículas maiores/aglomerados evidenciada pela formação do segundo pico a direita da curva, sendo a maior frequência apresentada pela amostras de partículas contendo *E. staigeriana*.

Os gráficos (Figura 11) corroboram com os dados da tabela (Tabela 4) na ordem do tamanho máximo de partículas (D_{90}), em que *E. globulus* < *E. citriodora* < *E. staigeriana*. É possível afirmar que a distribuição de tamanho da amostra de *E. staigeriana* (Figura 11) é aquela que apresenta a base maior, significando maior polidispersidade e que reflete em seu maior valor de Span (Tabela 4).

De acordo com Mukai-Correa et al. (2005), a polidispersidade está relacionada ao tipo de polissacarídeo, possibilitando a aglomeração entre as partículas, o que pode conferir a aglomeração das partículas, ocasionando erros para a correta determinação do tamanho das esferas.

Frascareli et al. (2012) avaliaram a microencapsulação de óleo de café torrado por *spray drying* utilizando goma arábica como material de parede e observaram comportamento semelhante em relação à distribuição de tamanho das partículas. As possíveis causas para a variação do tamanho das partículas estão relacionadas ao fato de esferas menores entrarem em vãos e pequenos espaços estre as esferas maiores. Já a presença de partículas maiores, que podem estar

associadas à formação de aglomerados, onde a formação de ligações irreversíveis pode levar à formação de partículas de tamanho maior.

5.1.3. Umidade e atividade de água (AA)

As partículas de OE produzidas de *E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus*, através da secagem em *Spray Dryer*, foram submetidas às análises de atividade de água (AA) e umidade.

Foi possível observar a diferenças entre a umidade e a atividade de água dos lotes de 2017 e 2018 (Tabela 5) dos óleos essenciais microencapsulados. A umidade e a AA dos lotes de 2017 foram superiores para todas as partículas de OEs, quando comparados aos mesmos parâmetros para os lotes produzidos em 2018. Provavelmente, isto se deve ao fato das análises das partículas serem realizadas no mesmo período, assim o lote de 2017 estava armazenado em recipiente de vidro e sob refrigeração por mais tempo que o lote de 2018. Ainda, o material de parede utilizado, a goma arábica, pode ter influenciado para o aumento da umidade e da AA.

Tabela 5. Conteúdo de umidade e atividade de água das partículas microencapsuladas a partir dos óleos essenciais de *Eucalyptus. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus* (valores médios $\pm$ DP)

Óleo essencial	Lote de 2017		Lote de 2018	
	Umidade (%)	AA	Umidade (%)	AA
<i>E. staigeriana</i>	9,2 $\pm$ 0,53	0,58 $\pm$ 0,009	4,7 $\pm$ 0,64	0,24 $\pm$ 0,015
<i>E. citriodora</i>	5,3 $\pm$ 1,14	0,33 $\pm$ 0,006	4,0 $\pm$ 0,65	0,31 $\pm$ 0,006
<i>E. globulus</i>	8,1 $\pm$ 0,11	0,56 $\pm$ 0,005	4,0 $\pm$ 0,66	0,33 $\pm$ 0,004

Legenda: DP = Desvio padrão. AA = atividade de água

Delfini (2016), em sua pesquisa sobre microencapsulação de óleo essencial de maracujá, utilizou a goma arábica como material de parede e encontrou partículas com umidade entre 2,07 e 4,41 e AA entre 0,106 e 0,116, ou seja maiores valores de umidade e menores valores de atividade de água.

Apesar da variação de umidade e atividade de água encontrada neste estudo, os valores obtidos não são elevados. Pode-se ressaltar que a umidade e atividade de água baixas contribuem para a conservação das micropartículas durante o seu armazenamento, pois esses parâmetros influenciam diretamente para o crescimento microbiano.

A capacidade de retenção de água de uma partícula está relacionada com a estrutura e porosidade da esfera, além de parâmetros do processo de secagem,

como a taxa de secagem e diferença entre as temperaturas de entrada e saída do ar (REINECCIUS et al., 1995).

Silva (2013) em estudo sobre a microencapsulação de extrato de pequi, verificou que as partículas que apresentaram menor atividade de água foram as produzidas com maior temperatura (180°C), para o extrato com razão fruta:água 1:3. Segundo o autor, temperaturas mais altas causam uma variação maior entre de temperaturas entre o produto atomizado e o ar de secagem, ocasionando maior transferência de calor e maior evaporação de água do produto, levando a umidades mais baixas.

5.1.4. Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia das partículas, contendo OE, produzidas por *Spray Dryer* foi avaliada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). De maneira geral, não houve grande alteração morfológica entre as partículas de *E. staigeriana* (Figura 12), *E. citriodora* (Figura 13) e *E. globulus* (Figura 14), pois além de todas as partículas apresentarem o mesmo material de parede (goma arábica), todas apresentaram basicamente a mesma estrutura e a mesma variação de tamanho. Foram observadas esferas rugosas e murchas para todos os OEs, com formato esférico e ausência de rachaduras ou orifícios.

O aspecto e o formato das partículas encontradas estão dentro dos parâmetros esperados, levando-se em consideração o tipo de matéria-prima utilizada, além do tipo de atomizador e especificações do processamento das partículas obtidas.

Figura 12. Microscopia Eletrônica de Varredura das partículas contendo OE de *E. staigeriana*, com aproximação de 4000X (A) e 5000X (B).

Figura 13. Microscopia Eletrônica de Varredura das partículas contendo OE de *Eucalyptus citriodora*, com aproximação de 4000X (A) e 5000X (B).

Figura 14. Microscopia Eletrônica de Varredura das partículas de *Eucalyptus globulus* com aproximação de 4000X (A) e 5000X (B).

Esferas grande variedade de tamanhos, formato esférico e irregular, com presença de rugosidades é típico de partículas produzidas por *spray drying* e isso se deve provavelmente ao encolhimento das gotas no início do processo de secagem, além do uso de elevadas temperaturas (SILVA, 2013). Também, com maiores taxas de secagem e elevadas temperaturas de entrada, a perda de água por evaporação se torna mais rápida, resultando na formação de paredes mais lisas e rígidas (TONON; BRABET; HUBINGER, 2008).

5.2. Composição química dos OEs livres e das partículas contendo OE de *E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus*

O OE livre de *E. staigeriana* contém 25 compostos, dos quais apenas um não foi identificado (Tabela 6). O composto majoritário foi o Limonene (29,41%), sendo os próximos mais abundantes o Geranial (11,36%), Terpinolene (8,65%) e Neral (8,22%). O OE de *E. staigeriana* é uma mistura complexa de compostos, e o seu potencial antifúngico pode estar relacionado à presença em maior quantidade do composto Limonene que é conhecido por exibir atividade antibacteriana, antifúngica e inseticida (ACAR et al., 2015; CUTILLAS et al., 2018; DORMAN; DEANS, 2008).

Diferentemente, no OE livre de *E. citriodora* foram identificados 15 compostos, sendo um não identificado (Tabela 7). O composto encontrado em maior quantidade foi o Citronellal (80,18%), seguido de Citronellol (6,98%). O Citronellal presente no OE apresenta propriedades antifúngicas (CAVALCANTI; ALMEIDA; PADILHA, 2011; SEIXAS et al., 2011).

Para o OE livre de *E. globulus* foram identificados 10 compostos e um não identificado (Tabela 8). O composto encontrado em maior abundância foi o 1,8-Cineole (93,41%), seguido do α -Pinene (3,81%). O 1,8-cineol e o α -pineno presentes no OE de *E. globulus*, são compostos relatados com propriedades antimicrobianas (AGGARWAL et al., 2002; BEN SASSI et al., 2008; LEITE et al., 2007; SAFAEI-GHOMI; AHD, 2010).

Maciel et al. (2010) estudaram três óleos essenciais de eucalipto que demonstraram serem eficazes sobre as fases do desenvolvimento de *L. longipalpis*. As composições foram diferentes para cada óleo, sendo os principais constituintes do OE de *E. staigeriana* o limoneno (28,82%), o *E. citriodora* continha citronelal

(71,77%) e o *E. globulus* apresentou 1,8-cineol (83,89%), os principais componentes foram testados em outros insetos e mostraram boa atividade.

De acordo com as especificações técnicas (Item 4.2) da empresa de onde os óleos essenciais foram obtidos, o OE de *E. staigeriana* apresentava como composto majoritário o Citral, também conhecido como Geranial. No entanto, observou-se que o composto em maior quantidade foi o Limonene. Para os OEs de *E. citriodora* e *E. globulus*, os compostos majoritários descritos são os mesmos encontrados nas análises, Citronellal e 1,8-cineol, respectivamente. Essas alterações são influenciadas por fatores genéticos e climáticos, como temperatura, intensidade de luz e efeito sazonal, já que parte destas espécies encontra-se próxima ao estado silvestre, mantendo forte interação com o ambiente (MORAIS, 2009).

Tabela 6. Compostos identificados na análise da composição química do OE livre de *E. staigeriana*.

Compostos ¹	Quantidade (%) ²	IRL ³
Limonene	29,41	1029
Geranial	11,36	1267
Terpinolene	8,65	1088
Neral	8,22	1238
Cineole <1,8->	6,18	1031
Geraniol	5,55	1252
Methyl geranate	4,12	1324
Pinene <α->	3,84	939
Cymene <p->	3,19	1024
Geranyl acetate	2,52	1381
Nerol	2,22	1229
Phellandrene <α->	2,16	1002
Pinene <β->	2,00	979
Terpinene <γ->	1,93	1059
Citronellal	1,66	1153
Terpinen-4-ol	1,40	1177
Terpineol <α->	0,99	1186
Neryl acetate	0,94	1359
Linalool	0,91	1096
Myrcene	0,88	990
Isocitral <(E)->	0,50	1180
NI	0,40	NI
Thujene <α->	0,33	930
Ocimene <(E)-β->	0,32	1050
Citronellyl acetate	0,32	1352

¹ Identificado por CG/MS, ² Quantidades relativas dos compostos identificados com base na área de cada pico na área total do cromatograma, ³ Índices de retenção linear calculados.

IRL = Índice de Retenção Linear; NI = composto não identificado.

Tabela 7. Compostos identificados na análise da composição química do OE livre de *E. citriodora*.

Composto ¹	Quantidade (%) ²	IRL ³
Citronellal	80,18	1153
Citronellol	6,98	1225
Isopulegol <neo->	3,59	1148
Isopulegol <iso->	2,85	1159
Cineole <1,8->	1,86	1031
Caryophyllene <(E)->	1,2	1426
Citronellyl acetate	1,07	1352
Pinene <β->	0,69	979
Pinene <α->	0,36	939
Isopulegol <neoiso->	0,27	1171
Limonene	0,26	1029
NI	0,25	NI
Terpinene <γ->	0,15	1059
Linalool	0,15	1096
Ocimene <(Z)-β->	0,14	1037

¹ Identificado por CG/MS, ² Quantidades relativas dos compostos identificados com base na área de cada pico na área total do cromatograma, ³ Índices de retenção linear calculados.

IRL = Índice de Retenção Linear; NI = composto não identificado.

Tabela 8. Compostos identificados na análise da composição química do OE livre de *E. globulus*.

Composto ¹	Quantidade (%) ²	IRL ³
Cineole <1,8->	93,41	1031
Pinene <α->	3,81	939
Cymene <p->	0,92	1024
Ocimene <(Z)-β->	0,47	1037
Pinene <β->	0,45	979
Myrcene	0,29	990
Terpinene <γ->	0,28	1059
Ocimene <(E)-β->	0,16	1050
Terpineol <α->	0,11	1188
NI	0,1	NI

¹ Identificado por CG/MS, ² Quantidades relativas dos compostos identificados com base na área de cada pico na área total do cromatograma, ³ Índices de retenção linear calculados.

IRL = Índice de Retenção Linear; NI = composto não identificado.

O OE de *E. staigeriana* contido nas partículas também foi analisado e apresentou 25 compostos, dos quais dois não foram identificados (Tabela 9). O composto majoritário foi o Limonene (29,92%), sendo os próximos mais abundantes o Geranial (11,87%) e Neral (8,26%).

O OE de *E. citriodora* obtido das partículas apresentou 15 compostos, sendo que dois não foram identificados (Tabela 10). O composto em maior quantidade foi o citronellal (77,5%), seguido de citronellol (8,5%).

Para o OE de *E. globulus* analisado das partículas, encontrou-se 10 compostos, onde um não foi identificado (Tabela 11) e em que o presente em maior abundância foi 1,8-cineol (93,41%), sendo que o seguinte foi o α-pinene (3,81%).

Tabela 9. Compostos identificados na análise da composição química da partícula contendo OE de *E. staigeriana*.

Composto ¹	Quantidade (%) ²	IRL ³
Limonene	29,92	1029
Geranial	11,87	1267
Neral	8,26	1235
Cineole <1,8->	6,51	1031
Geraniol	6,06	1252
Terpinolene	5,49	1088
Cymene <p->	5,07	1024
Methyl geranate	4,72	1324
Pinene <α->	3,94	939
Geranyl acetate	2,96	1381
Nerol	2,56	1229
Pinene <β->	2,11	979
Terpinen-4-ol	1,33	1177
Citronellal	1,19	1053
Linalool	1,11	1096
Neryl acetate	1,11	1361
Terpineol <α->	1,06	1188
Phellandrene <α->	1,01	1002
Terpinene <γ->	0,93	1059
NI	0,86	NI
Myrcene	0,67	990
Citronellyl acetate	0,38	1352
NI	0,37	NI
Thujene <α->	0,33	930
Ocimene <(E)-β->	0,18	1050

¹ Identificado por CG/MS, ² Quantidades relativas dos compostos identificados com base na área de cada pico na área total do cromatograma, ³ Índices de retenção linear calculados.

IRL = Índice de Retenção Linear; NI = composto não identificado.

Tabela 10. Compostos identificados na análise da composição química da partícula contendo OE de *E. citriodora*.

Composto ¹	Quantidade (%) ²	IRL ³
Citronellal	77,5	1153
Citronellol	8,5	1225
Isopulegol <neo->	4,39	1148
Isopulegol <iso->	2,96	1159
Cineole <1,8->	1,49	1031
Citronellyl acetate	1,38	1352
Caryophyllene <(E)->	1,27	1419
NI	0,76	NI
Pinene <β->	0,49	979
Isopulegol <neoiso->	0,33	1171
Pinene <α->	0,23	939
Limonene	0,22	1029
NI	0,19	NI
Linalool	0,17	1096
Terpinene <γ->	0,12	1059

¹ Identificado por CG/MS, ² Quantidades relativas dos compostos identificados com base na área de cada pico na área total do cromatograma, ³ Índices de retenção linear calculados.

IRL = Índice de Retenção Linear; NI = composto não identificado.

Tabela 11. Compostos identificados na análise da composição química da partícula contendo OE de *E. globulus*.

Composto ¹	Quantidade (%) ²	IRL ³
Cineole <1,8->	93,41	1031
Pinene <α->	3,81	939
Cymene <ρ->	0,92	1024
Ocimene <(Z)-β->	0,47	1037
Pinene <β->	0,45	979
Myrcene	0,29	988
Terpinene <γ->	0,28	1059
Ocimene <(E)-β->	0,16	1050
Terpineol <α->	0,11	1188
NI	0,1	NI

¹ Identificado por CG/MS, ² Quantidades relativas dos compostos identificados com base na área de cada pico na área total do cromatograma, ³ Índices de retenção linear calculados.

IRL = Índice de Retenção Linear; NI = composto não identificado.

É possível realizar uma comparação entre o OE livre e partícula contendo OE de *E. staigeriana*, onde os compostos majoritários presentes em ambos foram o Limonene, Geranial e Neral, respectivamente. No entanto, houve uma pequena variação na quantidade de cada composto, quando se compara o OE livre e o OE presente na partícula.

Para o OE de *E. citriodora* livre e contido na partícula, os compostos abundantes presentes nas duas análises foram Citronellal e Citronellol, respectivamente. Foi observado que houve relativa alteração na quantidade (%) de Citronellal do OE livre para o OE contido na partícula, de 80,18% e 77,5%, respectivamente.

Os três OEs estudados são voláteis, dessa forma as alterações podem ser decorrentes do processo de microencapsulação dos OEs por *Spray Drying*, onde há utilização de temperaturas relativamente elevadas para secagem da emulsão. Ainda há o processo de determinação de eficiência de encapsulação (EE), em que há uso de temperatura.

Na microencapsulação de óleos voláteis por *spray drying*, a retenção dos mesmos é favorecida por um fenômeno chamado difusão seletiva. Na atomização ocorre a formação de microgotas na câmara de secagem e com a temperatura elevada, há uma desidratação quase que instantânea da superfície das mesmas, criando uma película seca constituída pelo material de parede que reduz a volatilização dos compostos, mas permite a passagem da água, em função das diferenças de pesos e conformações moleculares. Sendo assim, o material volátil fica retido e a água evapora, finalizando a secagem (ALVIM; PRATA; GROSSO,

2016). Emulsões estáveis favorecem a retenção por reduzirem a presença de óleo na superfície da gota.

O OE de *E. globulus* (livre e partícula) obtiveram o 1,8-Cineole como o composto em maior quantidade. No entanto, não houve alteração na quantidade de cada composto entre os dois tipos de OE. Neste caso, o OE de *E. globulus* apresentou a melhor estabilidade quanto à microencapsulação deste OE.

5.3. Avaliação da eficiência *in vitro* dos óleos essenciais sobre *Rhizopus stolonifer*

5.3.1. Eficiência *in vitro* por contato dos óleos essenciais (OEs) livres

No ensaio da eficiência *in vitro* por contato utilizando os óleos essenciais livres, foram testadas concentrações variando entre 1000 a 2500 ppm para *E. staigeriana*, 2000 a 4500 ppm para *E. citriodora* e 3500 a 5500 para *E. globulus* (Tabela 12).

Tabela 12. Concentrações de óleos essenciais livres de três espécies de *Eucalyptus* utilizadas para os ensaios da eficiência *in vitro* sobre *Rhizopus stolonifer* de morango por contato.

Tratamentos	Concentração de OEs (ppm)
<i>E. staigeriana</i>	1000, 1500, 2000, 2500
<i>E. citriodora</i>	2500, 3000, 3500, 4000, 4500
<i>E. globulus</i>	3500, 4000, 4500, 5000, 5500

Os óleos essenciais apresentaram, em algum grau, capacidade de inibição do crescimento micelial do fungo *R. stolonifer*, apresentando comportamento concentração dependente, isto é, o crescimento micelial do fungo diminui com o aumento da concentração de OE.

Foi realizado experimento com duração de 2 dias, totalizando 4 leituras. O término do experimento foi estabelecido a partir do momento em que o tratamento controle atingiu o diâmetro total da placa, ou seja, quando o fungo alcançou seu máximo de crescimento na unidade experimental.

Os OEs de *E. staigeriana* e de *E. citriodora* evidenciaram a maior capacidade antifúngica, apresentando a menor CIM, com a inibição total do crescimento micelial do fungo ocorrendo entre as concentrações de 1000 e 3000 ppm (Tabela 13). Para *E. globulus*, a inibição se estabeleceu entre 4500 e 5000 ppm.

Tabela 13. Porcentagem de inibição (PI) do crescimento micelial de *Rhizopus stolonifer*, isolado de morango, e Concentração Inibitória Mínima (CIM) após exposição por contato a diferentes concentrações (ppm) de óleos essenciais livres incorporados ao meio batata-dextrose-ágar (BDA) (valores médios, n = 5).

Tratamento	Concentração (ppm)	PI (%)*	CIM**
Controle	-	-	-
<i>E. staigeriana</i>	1000	84,9	1000<CIM<1500
	1500	100	
	2000	100	
	2500	100	
<i>E. citriodora</i>	2500	93,0	2500<CIM<3000
	3000	100	
	3500	100	
	4000	100	
	4500	100	
<i>E. globulus</i>	3500	40,7	4500<CIM<5000
	4000	73,8	
	4500	88,8	
	5000	100	
	5500	100	

*PI=Porcentagem de inibição do crescimento micelial em relação ao tratamento controle. **CIM= Intervalo entre concentrações em que se podem encontrar valores de 100% de inibição do crescimento micelial; n= número de repetições utilizadas no experimento.

Ceschini (2011), em seu estudo sobre potencial antifúngico de extratos de folhas de *E. staigeriana* sobre *Aspergillus flavus*, encontrou a CIM, com uma concentração de 12000 ppm, já para o extrato metanólico da folha, a CIM foi obtida com uma concentração de 26000 ppm.

Venturoso e colaboradores (2011), em ensaio de atividade antifúngica utilizando extrato bruto e óleo essencial de *E. citriodora* contra espécies de *Cândida*, encontraram inibição do crescimento micelial em concentração de 8%. Rodrigues et. al (2006), em seu trabalho sobre a avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp, obtiveram resultados que mostraram que o extrato de eucalipto foi o mais eficiente na redução do crescimento micelial e da produção de esporos do fungo, em concentrações de 5 a 40%.

Piati e colaboradores (2011), em estudo sobre o efeito *in vitro* do óleo essencial de *E. globulus* sobre o crescimento e desenvolvimento de *Penicillium* sp., encontraram que o OE inibiu o crescimento de forma significativa nas concentrações

de 2500, 5000, 10000 ppm, não havendo diferença do controle com o fungicida azoxystrobin.

De acordo com Craveiro et al. (1981) e Souza et al. (2005), a maior ou menor atividade biológica dos óleos essenciais tem se mostrado dependente da composição de seus constituintes químicos, como citral, pineno, cineol, cariofileno, elemeno, furanodieno, imoneno, eugenol, eucaliptol, carvacrol e outros, cujos constituintes são responsáveis pelas propriedades antissépticas, antibacterianas, antifúngicas e antiparasíticas.

5.3.2. Eficiência *in vitro* por exposição aos voláteis dos óleos essenciais livres

No experimento da eficiência *in vitro* por contato utilizando os óleos essenciais livres, foram testadas concentrações variando entre 500 a 3000 ppm para *E. staigeriana*, 2500 a 4500 ppm para *E. citriodora* e 3000 a 5500 para *E. globulus* (Tabela 14).

Tabela 14. Concentrações de óleos essenciais (OEs) livres de três espécies de *Eucalyptus* utilizadas para os ensaios de eficiência *in vitro* sobre *Rhizopus stolonifer* de morango aos voláteis.

Tratamentos	Concentração de OE (ppm)
<i>E. staigeriana</i>	500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000
<i>E. citriodora</i>	2500, 3000, 3500, 4000, 4500
<i>E. globulus</i>	3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500

Os OEs de *E. staigeriana* e *E. citriodora* apresentaram a maior capacidade antifúngica, apresentando a menor CIM. A inibição total do crescimento micelial causada pelo OE de *E. staigeriana* foi observada com concentrações desse óleo entre 1000 e 2500 ppm, já a inibição causada pelo OE de *E. citriodora* ocorreu com concentrações entre 3000 e 3500 ppm (Tabela 15).

Para *E. staigeriana*, a CIM permaneceu a mesma, quando comparado ao ensaio *in vitro* por contato (item 5.3.1), no entanto para *E. citriodora*, a CIM para ensaio *in vitro* por exposição aos voláteis foi superior. Para *E. globulus*, a CIM está entre 5000 e 5500, sendo superior aos outros dois óleos e ao valor encontrado no ensaio *in vitro* por contato.

Tabela 15. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PI) de *Rhizopus stolonifer*, isolado de morango, e Concentração Inibitória Mínima (CIM), após exposição aos voláteis a diferentes concentrações (ppm) de óleos essenciais livres (valores médios, n = 5).

Tratamento	Concentração (ppm)	PI (%)*	CIM**
Controle	-	0,0	-
<i>E. staigeriana</i>	500	0,0	1000<CIM<1500
	1000	40,9	
	1500	100	
	2000	100	
	2500	100	
	3000	100	
<i>E. citriodora</i>	2500	74,88	3000<CIM<3500
	3000	83,6	
	3500	100	
	4000	100	
	4500	100	
<i>E. globulus</i>	3000	0,0	5000<CIM<5500
	3500	0,0	
	4000	0,0	
	4500	0,0	
	5000	0,0	
	5500	100	

*PI=Porcentagem de inibição do crescimento micelial em relação ao tratamento controle. **CIM= Intervalo entre concentrações em que se podem encontrar valores de 100% de inibição do crescimento micelial; n= número de repetições utilizadas no experimento.

5.3.3. Eficiência *in vitro* por exposição aos voláteis das partículas contendo OEs

No ensaio da eficiência *in vitro* por contato utilizando os óleos essenciais livres, foram testadas concentrações variando entre 500 a 3000 ppm para *E. staigeriana*, 1000 a 3500 ppm para *E. citriodora* e 2500 a 5500 para *E. globulus* (Tabela 16).

Tabela 16. Concentrações utilizadas para os ensaios de exposição aos voláteis utilizando as partículas dos OEs.

Tratamentos	Concentração de OE (ppm)
<i>E. staigeriana</i>	500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000
<i>E. citriodora</i>	1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500
<i>E. globulus</i>	2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500

Os OEs *E. staigeriana* e *E. citriodora* evidenciaram a maior capacidade antifúngica, assim como nos ensaios *in vitro* por contato e por exposição aos voláteis do OE livre (item 5.3.1 e 5.3.2), visto que foram os que apresentaram menor CIM. A inibição total do crescimento micelial de OE *E. staigeriana* ficou entre as concentrações 500 e 1000 ppm de OE, já a inibição de *E. citriodora* ficou entre 1500 e 2000 ppm e o OE de *E. globulus* teve sua inibição entre 3500 e 4000 ppm (Tabela 17).

Os intervalos de CIM encontrados para este experimento foram inferiores aos encontrados nos ensaios de OE livre por contato e por exposição aos voláteis, evidenciando que o método de exposição aos voláteis das partículas tem capacidade antifúngica mais eficaz que os ensaios anteriores.

Tabela 17. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Rhizopus stolonifer*, isolado de morango, e Concentração Inibitória Mínima (CIM), após exposição aos voláteis a diferentes concentrações (ppm) das partículas microencapsuladas de óleos essenciais de *Eucalyptus* (valores médios, n = 5).

Tratamento	Concentração (ppm)	PI (%)*	CIM**
Controle	-	-	-
<i>E. staigeriana</i>	500	94,2	500<CIM<1000
	1000	100	
	1500	100	
	2000	100	
	2500	100	
	2500	100	
	3000	100	
<i>E. citriodora</i>	1000	94,7	1500<CIM<2000
	1500	96,6	
	2000	100	
	2500	100	
	3000	100	
	3500	100	
<i>E. globulus</i>	2500	84,7	3500<CIM<4000
	3000	96,2	
	3500	99,0	
	4000	100	
	4500	100	
	5000	100	
	5500	100	

*PI=Porcentagem de inibição do crescimento micelial em relação ao tratamento controle. **CIM= Intervalo entre concentrações em que se podem encontrar valores de 100% de inibição do crescimento micelial; n= número de repetições utilizadas no experimento.

5.4. Avaliação da eficiência *in vivo* das partículas *Rhizopus stolonifer*

Para a avaliação da eficiência *in vivo* foram selecionadas as partículas contendo OE de *E. staigeriana* e *E. citriodora*, que obtiveram os melhores desempenhos na avaliação da eficiência *in vitro* (item 5.3). A quantidade de partículas de OE de *E. staigeriana* e *E. citriodora* foram calculadas levando-se em consideração a inibição no ensaio de eficiência *in vitro* por exposição aos voláteis das partículas (item 5.3.3).

A Incidência da doença (%) indica a percentagem de frutas mostraram sintomas típicos da podridão mole durante o período de incubação, sendo calculada a partir do número de frutas sintomáticas no último dia de armazenamento (Figura 15).

Figura 15. Sintomas de podridão mole, causada pelo *Rhizopus stolonifer*, em morangos submetidos a diferentes tratamentos contendo óleo essencial (OE) de *Eucalyptus citriodora* no quarto dia de armazenamento (A: Controle; B: OE livre; C: Partícula contendo OE).

Considerando-se a média das incidências das doenças (Figura 16) para os dois ensaios, verificou-se que os valores foram elevados para o controle e partículas e baixo para o tratamento OE livre. Valores elevados de incidência da doença nesses experimentos são justificáveis e esperados, visto que foram realizados em condição de elevada pressão de inóculo para uma fruta madura. Assim, o patógeno teve as condições ideais de crescimento e consequente desenvolvimento da doença, o que foi agravado pela temperatura de armazenamento, definida com o intuito de propiciar o crescimento do microrganismo, umidade, além dos nutrientes presentes na fruta.

Figura 16. Incidência média (%) da podridão mole em morangos inoculados com *Rhizopus Stolonifer* submetidos ou não (Controle) a diferentes tratamentos com óleos essenciais livres (OEs livres) e óleos essenciais encapsulados (partícula) de duas espécies de *Eucalyptus*.

A severidade da doença causada pelo fungo, considerando dois ensaios do experimento, foi calculada a partir dos valores de índice de doença, os quais foram expressos em AACPD (Tabela 18). Esse valor resume de forma quantitativa a intensidade da doença ao longo do tempo, combinando múltiplas observações do progresso da doença em um único valor (SIMKO; PIEPHO, 2012).

Tabela 18. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) referente à severidade podridão mole causada por *Rhizopus stolonifer* em morangos “Oso Grande” (valores médios, $\pm$ DP) submetidos ou não (controle) a diferentes tratamentos com óleos essenciais livres (OE livre) e óleos essenciais encapsulados (partícula) de duas espécies de *Eucalyptus*.

Tratamento	<i>E. staigeriana</i>	<i>E. citriodora</i>
Controle	206,56 $\pm$ 16,7 A	205,72 $\pm$ 16,0 A
OE livre	12,19 $\pm$ 8,3 C	2,29 $\pm$ 2,4 C
Partícula	128,85 $\pm$ 23,7 B	77,08 $\pm$ 33,1 B

Letras distintas nas colunas representam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). DP = Desvio padrão da média, n = n° de frutas utilizadas por tratamento.

A severidade da doença causada por *R. stolonifer* em morangos submetidos a diferentes tratamentos diferiu estatisticamente. A severidade da doença foi menor ($P < 0,05$) nas frutas tratadas com os óleos essenciais livres (OE livre) de *E. staigeriana* e *E. citriodora* e com as partículas desses óleos, indicando que esses tratamentos reduziram o progresso da doença, sendo a atuação do OE direta no patógeno. A AACPD para o OE de *E. citriodora*, tanto tratamento OE livre como tratamento partícula, apresentou efeito mais efetivo quando comparado aos valores médios encontrados para o óleo essencial de *E. staigeriana*, além de ambos diferirem de forma significativa do tratamento controle ($P < 0,05$).

A partir dos valores de índice de doença (ID%) foram construídas curvas de progressão da podridão mole causada pelo *Rhizopus stolonifer* (Figura 17). Observa-se que os comportamentos dos óleos essenciais de *E. staigeriana* e *E. citriodora* foram semelhantes, havendo desenvolvimento mais rápido da doença no tratamento controle e menores nos tratamentos OE livre e Partícula. Os tratamentos OE livre e Partícula de *E. citriodora* (Figura 17B) exibiram progresso da doença mais lento, quando comparado à progressão da doença do *E. staigeriana* (Figura 17A).

Legenda: ID (%): índice de doença. C: frutas sem tratamento/controle. OE: frutas tratadas com óleo essencial livre. P: frutas tratadas com partículas

Figura 17. Curvas de progressão da doença podridão mole, causada pelo *Rhizopus stolonifer* expressas em índice de doença (ID %) em morangos submetidos a diferentes tratamentos utilizando os óleos essenciais de *Eucalyptus staigeriana* (A) e *E. citriodora* (B) na forma livre ou encapsulados.

Os tratamentos não inibiram o crescimento do fungo inoculado no morango (Figura 17). Essa diferença era esperada, uma vez que os componentes hidrofóbicos do óleo essencial são prejudicados por interações com componentes da matriz alimentar (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012). Além das propriedades intrínsecas dos alimentos, como teor de gordura, proteína, água, antioxidantes e pH, há também determinantes extrínsecos capazes de influenciar na sensibilidade dos

microrganismos ao OE, como a temperatura, embalagem (vácuo, gases, ar), características dos microrganismos e nível de contaminação (BURT, 2004).

O OE de *E. staigeriana* é conhecido pelo seu poder antifúngico. Em estudo de Gilles et al. (2010), avaliaram a atividade antimicrobiana de três espécies de eucalipto, entre elas *E. staigeriana* encontrando grau variável de atividade antimicrobiana, com o o óleo de *E. staigeriana* apresentando a maior atividade, no qual as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis aos óleos essenciais do que as bactérias Gram-negativas.

Em estudo sobre controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão utilizando os óleos de *C. citratus* e *E. citriodora*, encontrou-se ação intermediária deste último óleo quando o inóculo fúngico foi aplicado imediatamente após o tratamento e quando inoculado 24 horas após o tratamento com *E. citriodora* (CARNELOSSI et al., 2009).

5.5. Avaliação da qualidade físico-química e sensorial de morangos tratados com partícula contendo *E. citriodora*

5.5.1. Análises físico-químicas

As análises físico-químicas (Tabela 13) foram realizadas com o intuito de verificar se os morangos apresentariam diferença com a aplicação do tratamento Partícula (P); o tratamento OE livre foi realizado a fim de possibilitar a comparação os efeitos do OE livre com a partícula.

Os morangos tratados com partículas contendo óleo essencial (P) foram os que apresentaram as maiores taxas de perda de massa, já o controle e o tratamento OE livre apresentaram valores semelhantes de perda de massa. Os valores inferiores de perda de massa devem-se ao fato das embalagens de polietileno serem armazenadas em sacos plásticos (Figura 18). As médias maiores de perda de massa para partícula (P) podem estar relacionadas aos sachês com o OE microencapsulado, já que o material de parede da partícula é higroscópico.

Figura 18. Embalagens de polietileno utilizadas para armazenar os morangos tratados (A) e sacos plásticos utilizados para embalar as embalagens de polietileno (B).

Os frutos tratados com OE livre e Partícula apresentaram valores inferiores de degradação por fungos e de índice de doenças (Figura 19) quando comparado ao controle. Esse resultado era esperado, já que foi observada ação semelhante dos tratamentos contendo OE de *E. citriodora* nas avaliações *in vitro* e *in vivo* do estudo.

Figura 19. Aparência dos morangos submetidos aos tratamentos no dia 1 (A) e armazenados sob refrigeração após 18 dias (B). Da esquerda para direita: Controle, OE livre e Partícula (A e B).

O Ratio ou índice de maturação é o equivalente entre os ácidos orgânicos (representado pela acidez titulável) e os açúcares (representado pelo Teor de sólidos solúveis), e é utilizado como critério de avaliação do flavor da fruta, em que os valores acima de 10 são adequados ao paladar do consumidor (CHITARRA; CHITARRA, 1990). Para todos os tratamentos, houve aumento do ratio, evidenciando que o óleo não apresenta importante influencia sobre este índice (Tabela 19).

Já para compostos fenólicos totais (CF) e antocianinas totais monoméricas, foram observados valores inferiores quando comparados às amostras controle. Os efeitos observados podem estar relacionados às concentrações de OE (livre e partícula) aplicada nos tratamentos dos morangos, o que pode ter ocasionado em degradação dos pigmentos e diminuição dos antioxidantes.

Para a cor (luminosidade, ângulo de cor Hue e cromaticidade), as amostras não evidenciaram diferença ao longo dos períodos e pouca diferença entre os tratamentos. As maiores diferenças foram observadas nos tratamentos OE livre e partícula.

Os resultados de firmeza mostraram decréscimo dos valores para os tratamentos OE livre e partícula (P) durante os períodos de armazenamento, o que não foi observado no controle. Para pH não houve diferença entre os tratamentos e os períodos, indicando que o óleo essencial não exerce influencia sobre este fator.

Tabela 19. Resultados das análises físico-químicas realizadas em morangos submetidos ou não (controle) a diferentes tratamentos com óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* na forma livre (OE livre) ou encapsulado (partícula) armazenados sob refrigeração por 18 dias (média, $\pm$ desvio padrão, n = 4).

Trat	Períodos de armazenamento						
	1	3	6	9	12	15	18
Perda de massa (%)							
C	0,00 $\pm$ 0,0	0,05 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,02	0,68 $\pm$ 0,03
OE livre	0,00 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,06	0,32 $\pm$ 0,05	0,36 $\pm$ 0,05	0,42 $\pm$ 0,06	0,61 $\pm$ 0,18
P	0,00 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,01	0,66 $\pm$ 0,14	1,36 $\pm$ 0,14	2,14 $\pm$ 0,26	2,28 $\pm$ 0,10	3,20 $\pm$ 0,32
Índice da ocorrência de doenças no pericarpo							
C	0,0 $\pm$ 0,0	0,50 $\pm$ 1,00	0,25 $\pm$ 0,86	1,25 $\pm$ 1,65	1,25 $\pm$ 3,31	6,25 $\pm$ 4,76	8,25 $\pm$ 5,00
OE livre	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,00 $\pm$ 3,16
P	0,0 $\pm$ 0,0	0,25 $\pm$ 0,86	0,25 $\pm$ 0,86	0,25 $\pm$ 0,86	0,0 $\pm$ 0,0	0,50 $\pm$ 1,65	2,50 $\pm$ 2,23
Degradação por fungos (%)							
C	0,0 $\pm$ 0,0	5,00 $\pm$ 5,00	2,50 $\pm$ 4,33	12,5 $\pm$ 8,29	12,50 $\pm$ 12,99	62,50 $\pm$ 17,85	82,50 $\pm$ 4,33
OE livre	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	20,00 $\pm$ 15,81
P	0,0 $\pm$ 0,0	2,50 $\pm$ 4,33	2,50 $\pm$ 4,33	2,50 $\pm$ 4,33	0,0 $\pm$ 0,0	5,00 $\pm$ 5,00	25,00 $\pm$ 11,18
Luminosidade (L*)							
C	35,51 $\pm$ 1,16 Aa	35,93 $\pm$ 0,83 Aa	37,49 $\pm$ 1,36 Aa	35,56 $\pm$ 1,32 Aa	38,65 $\pm$ 1,53 Aa	35,32 $\pm$ 1,20 Aa	37,75 $\pm$ 1,74 Aa
OE livre	35,98 $\pm$ 1,77 Aa	32,20 $\pm$ 0,77 Bb	32,02 $\pm$ 1,24 Bb	33,78 $\pm$ 1,43 Aa	33,04 $\pm$ 0,95 Ab	34,20 $\pm$ 1,08 Aa	36,10 $\pm$ 0,56 Aab
P	35,60 $\pm$ 0,60 Aa	33,73 $\pm$ 0,54 ABab	32,49 $\pm$ 2,04 ABb	31,60 $\pm$ 0,98 Bb	32,19 $\pm$ 0,72 ABb	34,30 $\pm$ 0,72 ABa	34,14 $\pm$ 0,48 ABb
Ângulo de cor Hue (graus)							
C	44,57 $\pm$ 0,69 Aa	42,27 $\pm$ 0,98 Aa	44,04 $\pm$ 1,37 Aa	42,85 $\pm$ 1,00 Aa	45,82 $\pm$ 2,04 Aa	42,10 $\pm$ 1,05 Aa	43,62 $\pm$ 2,40 Aa
OE livre	41,65 $\pm$ 2,04 Aa	37,53 $\pm$ 1,34 ABb	38,03 $\pm$ 1,32 ABb	37,43 $\pm$ 0,89 Bb	37,93 $\pm$ 1,30 ABb	36,89 $\pm$ 2,11 Bb	40,28 $\pm$ 0,70 Aa
P	41,74 $\pm$ 0,56 Aa	39,58 $\pm$ 0,75 ABab	37,65 $\pm$ 1,96 ABCb	36,52 $\pm$ 0,78 BCb	36,15 $\pm$ 1,16 BCb	35,94 $\pm$ 0,73 BCb	34,43 $\pm$ 1,17 Cb
Cromaticidade							
C	43,47 $\pm$ 1,57 Ba	45,43 $\pm$ 0,42 ABa	46,78 $\pm$ 0,44 ABa	46,12 $\pm$ 0,97 ABa	48,71 $\pm$ 1,03 Aa	45,35 $\pm$ 1,23 ABa	45,16 $\pm$ 0,77 ABa
OE livre	42,26 $\pm$ 1,37 Aa	35,40 $\pm$ 0,90 Bb	29,41 $\pm$ 0,99 Cc	28,82 $\pm$ 1,81 Cb	26,32 $\pm$ 0,54 CDc	26,74 $\pm$ 0,58 CDc	24,39 $\pm$ 0,33 Db
P	44,23 $\pm$ 0,89 Aa	42,10 $\pm$ 0,51 Aa	36,21 $\pm$ 2,38 Bb	32,75 $\pm$ 4,55 BCb	31,50 $\pm$ 0,69 Cb	31,34 $\pm$ 0,47 Cb	24,96 $\pm$ 0,86 Db

Continua.

C = morangos controle; OE livre = morangos tratados com óleo essencial livre de *E. citriodora* e P = morangos tratados com partículas de *E. citriodora*. DP = desvio padrão n = número de repetições.

Nota: médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de significância de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Tabela 19. Resultados das análises físico-químicas realizadas em morangos submetidos ou não (controle) a diferentes tratamentos com óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* na forma livre (OE livre) ou encapsulado (partícula) armazenados sob refrigeração por 18 dias (média, $\pm$ desvio padrão, n = 4).

Continuação.							
Períodos de armazenamento							
Trat	1	3	6	9	12	15	18
Firmeza							
C	1,79 $\pm$ 0,11 Aa	1,50 $\pm$ 0,50 Aa	1,77 $\pm$ 0,04 Aa	1,61 $\pm$ 0,09 Aa	1,48 $\pm$ 0,07 Aa	1,65 $\pm$ 0,21 Aa	1,76 $\pm$ 0,25 Aa
OE livre	1,12 $\pm$ 0,20 Ab	0,74 $\pm$ 0,16 Bc	0,73 $\pm$ 0,16 Bb	0,64 $\pm$ 0,05 Bb	0,56 $\pm$ 0,04 Bb	0,64 $\pm$ 0,07 Bb	0,60 $\pm$ 0,03 Bb
P	1,66 $\pm$ 0,06 Aa	1,15 $\pm$ 0,05 Bb	0,69 $\pm$ 0,07 Cb	0,65 $\pm$ 0,05 Cb	0,54 $\pm$ 0,09 Cb	0,63 $\pm$ 0,05 Cb	0,63 $\pm$ 0,05 Cb
pH							
C	3,14 $\pm$ 0,68 Aa	3,65 $\pm$ 0,01 Aa	3,16 $\pm$ 0,67 Aa	3,57 $\pm$ 0,05 Aa	3,60 $\pm$ 0,01 Aa	3,62 $\pm$ 0,07 Aa	3,69 $\pm$ 0,10 Aa
OE livre	3,54 $\pm$ 0,05 Aa	3,73 $\pm$ 0,02 Aa	3,67 $\pm$ 0,02 Aa	3,72 $\pm$ 0,04 Aa	3,66 $\pm$ 0,02 Aa	3,70 $\pm$ 0,05 Aa	3,66 $\pm$ 0,04 Aa
P	3,57 $\pm$ 0,05 Aa	3,70 $\pm$ 0,08 Aa	3,65 $\pm$ 0,04 Aa	3,73 $\pm$ 0,03 Aa	3,77 $\pm$ 0,03 Aa	3,71 $\pm$ 0,03 Aa	3,69 $\pm$ 0,04 Aa
Ratio							
C	6,02 $\pm$ 0,95 Aa	6,87 $\pm$ 0,92 Aa	6,59 $\pm$ 0,29 Aa	6,49 $\pm$ 0,51 Aa	7,34 $\pm$ 0,60 Aa	7,32 $\pm$ 0,77 Aa	7,42 $\pm$ 0,85 Aa
OE livre	5,72 $\pm$ 0,25 Aa	5,58 $\pm$ 0,63 Aa	6,33 $\pm$ 0,60 Aa	7,11 $\pm$ 0,41 Aa	6,64 $\pm$ 0,85 Aa	7,41 $\pm$ 0,81 Aa	6,36 $\pm$ 0,66 Aa
P	5,92 $\pm$ 1,33 Aa	6,22 $\pm$ 0,86 Aa	6,00 $\pm$ 0,54 Aa	7,60 $\pm$ 0,19 Aa	6,78 $\pm$ 1,24 Aa	6,50 $\pm$ 0,47 Aa	5,98 $\pm$ 0,30 Aa
Antocianinas totais monoméricas							
C	9,79 $\pm$ 1,85 ABa	13,98 $\pm$ 1,66 ABa	16,13 $\pm$ 2,63 Aa	16,05 $\pm$ 1,99 Aa	7,72 $\pm$ 2,10 Ba	10,24 $\pm$ 1,27 ABa	9,88 $\pm$ 2,97 ABa
OE livre	11,23 $\pm$ 2,78 ABa	11,73 $\pm$ 1,42 Aa	9,26 $\pm$ 1,93 ABa	7,78 $\pm$ 3,16 ABb	5,90 $\pm$ 0,76 ABa	4,47 $\pm$ 2,04 Ba	5,21 $\pm$ 2,95 ABa
P	13,85 $\pm$ 1,64 Aa	10,61 $\pm$ 4,09 ABa	13,55 $\pm$ 3,68 Aa	6,56 $\pm$ 3,14 Bb	7,76 $\pm$ 1,16 ABa	6,60 $\pm$ 1,07 Ba	5,49 $\pm$ 0,57 Ba
Compostos fenólicos totais							
C	0,37 $\pm$ 0,05 Ba	0,38 $\pm$ 0,02 ABa	0,46 $\pm$ 0,04 Aa	0,42 $\pm$ 0,02 ABa	0,33 $\pm$ 0,02 Ba	0,37 $\pm$ 0,02 Ba	0,39 $\pm$ 0,03 ABa
OE livre	0,35 $\pm$ 0,03 ABa	0,34 $\pm$ 0,02 ABa	0,41 $\pm$ 0,02 Aa	0,33 $\pm$ 0,01 ABb	0,29 $\pm$ 0,03 Ba	0,28 $\pm$ 0,03 Bb	0,28 $\pm$ 0,01 Bb
P	0,42 $\pm$ 0,01 Aa	0,38 $\pm$ 0,04 ABa	0,44 $\pm$ 0,03 Aa	0,37 $\pm$ 0,04 ABab	0,31 $\pm$ 0,01 BCa	0,31 $\pm$ 0,02 BCab	0,28 $\pm$ 0,01 Cb

C = morangos controle; OE livre = morangos tratados com óleo essencial livre de *E. citriodora* e P = morangos tratados com partículas de *E. citriodora*. DP = desvio padrão n = número de repetições.

Nota: médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de significância de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

5.5.2. Análise sensorial: teste de diferença de controle

A equipe sensorial foi formada por 23 provadores, no primeiro período e 22 provadores, no segundo período, todos não treinados, de ambos os sexos, sendo aproximadamente 70% do sexo feminino, com faixa etária variando entre 18 e 60 anos.

O teste de diferença do controle possibilitou a comparação das amostras tratadas ou não com OE de *E. citriodora* (OE livre e P, respectivamente) com a amostra controle (sem tratamento). O atributo cor de morango do primeiro período foi o único atributo em que o tratamento OE livre exibiu diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle e o tratamento com partícula (P) não diferiu estatisticamente do controle.

A avaliação sensorial referente aos atributos cor e aroma de morango, aparência e diferença sensorial geral, dos dois períodos avaliados, apontou diferenças significativas das amostras OE livre e P, diferindo significativamente do controle ao nível de significância de 5%, no entanto, os morangos com OE livre diferiram em maior grau que o morango tratado com partículas (P) (Tabela 20).

Tabela 20. Resultados médios obtidos no Teste de Diferença do Controle referente aos atributos sensoriais de morangos tratados ou não com óleos essenciais (livre e partícula) de *Eucalyptus citriodora* armazenados sob refrigeração durante 6 dias (primeiro período) e 13 dias (segundo período).

Tratamentos	Primeiro período			
	Atributos sensoriais			
	Cor de morango	Aroma de morango	Aparência	Diferença sensorial geral
C	2,47	1,47	2,56	2,17
OE livre	7,00 *	9,34 *	7,39 *	8,30 *
P	3,86 ^{n.s.}	8,13 *	4,91 *	6,08 *
Tratamentos	Segundo período			
	Atributos sensoriais			
	Cor de morango	Aroma de morango	Aparência	Diferença sensorial geral
C	1,68	2,09	2,18	1,90
OE livre	8,27 *	8,81 *	8,40 *	8,81 *
P	7,45 *	8,77 *	7,86 *	8,27 *

C = morangos controle; OE livre = morangos tratados óleo essencial livre e P = morangos tratados com partículas microencapsuladas de *E. citriodora*; * = considera-se diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre a amostra e o controle (C); n.s. = não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre a amostra e o controle.

Os resultados indicam que o OE de *E. citriodora* alterou as características sensoriais dos morangos, sendo os atributos aroma de morango e diferença sensorial geral, os que mais diferença do controle. As notas dos atributos do

tratamento Partícula (P), do primeiro período, foram próximas ao controle. Já as notas do segundo período foram semelhantes às notas do tratamento OE livre.

Nesse sentido, os termos mais descritos pelos provadores em relação à percepção do aroma e a diferença sensorial geral para as amostras contendo OE livre, da maior para menor frequência, foram: produto de limpeza, eucalipto, desinfetante e óleo essencial. Para diferença sensorial geral, foram utilizados os termos: coloração escura, amarronzado, cor desbotada, cozido, sem textura.

A concentração de OE de *E. citriodora* aplicada sobre os morangos foi considerada alta (2000 ppm), o que pode ter afetado de maneira negativa as características sensoriais dos morangos. Dessa forma, os provadores indicaram como amostra preferida a controle, com 86% para o primeiro período e 100% para o segundo período. Ainda assim, a amostra com tratamento P teve a preferência de 14% dos provadores no primeiro período.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A combinação de goma arábica e óleos essenciais mostrou-se uma boa alternativa para a proteção dos OEs, além disso a técnica de microencapsulação por *spray drying* apresentou-se como um método inovador para proteger os óleos essenciais de *E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus*, possibilitando um aumento da vida útil, estabilidade do produto, desenvolvimento de novos produtos e a aplicação na pós-colheita.

Os óleos essenciais de *E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus* livre e contido nas partículas apresentaram composição química do OE de *E. staigeriana* evidenciou 25, 15 e 10 compostos, respectivamente. Sendo o limonene, citronellal e o 1,8-cineole os compostos majoritários, respectivamente em cada OE.

Os óleos essenciais apresentaram atividade antifúngica contra o patógeno *R. stolonifer*. Os OEs de *E. staigeriana* e *E. citriodora* e suas partículas apresentaram a maior capacidade de inibição de crescimento fúngico, exibindo as menores CIM. No entanto, durante o ensaio de eficiência *in vivo*, o tratamento OE livre de *E. citriodora* apresentou melhor ação quando comparado com o tratamento partícula do mesmo óleo, já que ele teve melhor capacidade para diminuir a severidade da doença causada por *R. stolonifer*. Quando comparado ao OE *E. staigeriana* e sua partícula, o OE de *E. citriodora* apresentou melhor capacidade para diminuir a severidade da doença causada pelo fungo.

No experimento pós-colheita, os morangos tratados com a partícula de *E. citriodora* apresentaram redução da degradação fúngica durante o armazenamento refrigerado, indicando conservação da sua qualidade. Já para os parâmetros físico-químicos (cor, firmeza, pH, ratio, antocianinas e compostos fenólicos) não houve relativa alteração quando comparados aos demais tratamentos. No entanto, a avaliação sensorial evidenciou alteração da cor, aroma e aparência do morango.

7. CONCLUSÕES

O uso de óleos essenciais microencapsulados é uma alternativa potencial aos fungicidas sintéticos para o controle pós-colheita da podridão mole em morangos, uma vez que as partículas foram capazes de retardar o desenvolvimento do fungo causador da doença. Contudo, estudos complementares são necessários, a fim de melhorar a formulação do produto, já que causaram alterações sensoriais no morango.

REFERÊNCIAS

ABURTO, L. C.; TAVARES, D. DE Q.; MARTUCCI, E. T. **Microencapsulação de óleo essencial de laranja**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/2010/veiculos_de_comunicacao/CTA/VOL18N1/CTA18N1_08.PDF>. Acesso em: 17 jun. 2019.

ACAR, Ü. et al. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. **Aquaculture**, v. 437, p. 282–286, fev. 2015.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007. v. 4

AGGARWAL, K. K. et al. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, n. 1, p. 59–63, 1 jan. 2002.

AHN, J.-H. et al. Optimization of microencapsulation of seed oil by response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 98–105, 1 mar. 2008.

AKTHAR, M. et al. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. **Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2014.

ALI, A.; WEE PHENG, T.; MUSTAFA, M. A. Application of lemongrass oil in vapour phase for the effective control of anthracnose of ‘Sekaki’ papaya. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 6, p. 1456–1464, 1 jun. 2015.

ALIKHANI, M.; DARAEI GARMAKHANY, A. Effect of microencapsulated essential oils on storage life and quality of strawberry (*Fragaria ananassa* cv. Camarosa). **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, v. 4, n. 2, p. 106–112, 1 jun. 2012.

ALVIM, I. D.; PRATA, A. S.; GROSSO, C. R. F. Methods of Encapsulation. In: **Edible Films and Coatings: Fundamentals and Applications**. [s.l.] CRC Press, 2016. p. 299–3011.

ANTUNES, L. E. C.; REISSER JÚNIOR, C.; SCHWENGBER, J. E. **Morangueiro**. 1ª ed. Brasília: [s.n.].

AOAC. **Official Methods of Analysis**. [s.l.] AOAC International, 2005.

BAE, E. K.; LEE, S. J. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, n. 8, p. 549–560, 20 dez. 2008.

BEN SASSI, A. et al. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil of (Tunisian) *Chrysanthemum trifurcatum* (Desf.) Batt. and Trab. flowerheads. **Comptes Rendus Chimie**, 2008.

BERTINI, L. M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, p. 80–83, 2005.

BHAT, R.; STAMMINGER, R. Preserving Strawberry Quality by Employing Novel Food Preservation and Processing Techniques - Recent Updates and Future Scope - An Overview. **Journal of Food Process Engineering**, v. 38, n. 6, p. 536–554, 1 dez. 2015.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, 2009.

BONALDO, S. M. et al. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). **Summa Phytopathol**, v. 33, n. 4, p. 383–387, 2007.

BORGES, C. D. et al. Conservação de morangos com revestimentos à base de goma xantana e óleo essencial de sálvia. **Biosci. J.**, v. 29, n. 5, p. 1071–1083, 2013.

BORN, F. DE S. **Atividade de óleos essenciais de plantas das famílias Burseraceae, Lamiaceae, Rutaceae e Verbenaceae em Tetranychus urticae Koch e Neoseiulus californicus (McGregor)**. [s.l.] Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012.

BROOKER, M. I. H.; KLEINIG, D. A. **Field guide to eucalypt**. 1. ed. [s.l.] Inkata Press Pty Ltd, 1983.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 1 ago. 2004.

CALO, J. R. et al. **Essential oils as antimicrobials in food systems - A review** **Food Control**, 2015.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. Raleigh: John Wiley & Sons., 1990.

CARNELOSSI, P. R. et al. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 11, n. 4, p. 399–406, 2009.

CARVALHO, A. G. S. **Microencapsulação de óleo de café verde por spray drying a partir de emulsões estabilizadas por lecitina e quitosana**. [s.l.] Universidade de Campinas (UNICAMP), 2013.

CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. DE F. D.; PADILHA, W. W. N. **Atividade antifúngica de três óleos essenciais sobre cepas de Candida**. [s.l.] Associação Brasileira de Odontologia - Seção Goiás, 2011. v. 20

CESCHINI, V. C. **Potencial antifúngico de extratos de folhas de Eucalyptus staigeriana F. Muell. sobre Aspergillus flavus**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, out. 2011.

CHAGAS, A. C. S. et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de Eucalyptus spp em Boophilus microplus. Acaricide effect of Eucalyptus spp essential oils and concentrated emulsion on Boophilus microplus. **Braz. J. Res. Anim. Sci**, v. 39, n. 5, p. 247–253, 2002.

CHITARRA, M.; CHITARRA, A. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: UFLA, 1990.

CIA, P. et al. QUITOSANA NO CONTROLE PÓS-COLHEITA DA PODRIDÃO MOLE EM CAQUI “RAMA FORTE”. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 745–752, 2010.

COSTA, P. et al. Cyclodextrins enhance the antioxidant activity of essential oils from three Lamiaceae species. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 341–346, 1 ago. 2015.

CRAVEIRO A.A.; FERNANDES A.G.; ANDRADE C.H.S.; MATOS F.J.A.; ALENCAR J.W.; **Óleos essenciais de Plantas do Nordeste**. [s.l.] UFC, 1981.

CRUZ, M. M. et al. Efeito de óleos essenciais e revestimentos comestíveis sobre podridões pós-colheita em manga, CV Kent. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 2, p. 1–6, 2012.

CUTILLAS, A.-B. et al. Thymus mastichina L. essential oils from Murcia (Spain): Composition and antioxidant, antienzymatic and antimicrobial bioactivities. **Plos One**, v. 13, n. 1, 2018.

DELFINI, F. T. **Microencapsulação de óleo da semente de maracujá através da secagem por atomização**. [s.l.] Universidade de Campinas (UNICAMP), 2016.

DIAS-ARIEIRA, C. R. et al. Atividade do óleo de Eucalyptus citriodora e Azadirachta indica no controle de Colletotrichum acutatum em morangueiro. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 3, p. 228–232, 2010a.

DIAS-ARIEIRA, C. R. et al. Atividade do óleo de Eucalyptus citriodora e Azadirachta indica no controle de Colletotrichum acutatum em morangueiro. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 3, p. 228–232, set. 2010b.

DONSÌ, F. et al. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 9, p. 1908–1914, 1 nov. 2011.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308–316, 1 fev. 2008.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **PHYTOCHEMICAL BULLETIN**, v. 19, p. 11–15, 1987.

DUARTE-MOLINA, F. et al. Storage quality of strawberry fruit treated by pulsed light: Fungal decay, water loss and mechanical properties. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 34, p. 267–274, 1 abr. 2016.

ELAISSI, A. et al. Antibacterial activity and chemical composition of 20 Eucalyptus species' essential oils. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1427–1434, 15 dez. 2011.

FAO. **Food wastage footprint: Impacts on natural resources - Summary report**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.fao.org/publications>. Acesso em: 1 jul. 2019.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; ET AL. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103–112, 2008.

FERNANDES, L. P. **Desenvolvimento tecnológico de produtos particulados obtidos a partir de Lippia sidoides pela técnica de spray drying e avaliação das propriedades antifúngicas**. Ribeirão Preto: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 23 jan. 2009.

FRASCARELI, E. C. et al. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 413–424, 1 jul. 2012.

GALEGÁRIO, F. F. et al. Sistema de produção de morango para mesa na região da Serra Gaúcha e encosta superior do nordeste. **EMBRAPA Uva e Vinho: Sistema de Produção**, 6. ISSN 1678-8761, Versão Eletrônica, Dez./2005.

GHARSALLAOUI, A. et al. **Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview** *Food Research International*, 2007.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistencia de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.

GIL, M. I.; HOLCROFT, D. M.; KADER, A. A. Changes in Strawberry Anthocyanins and Other Polyphenols in Response to Carbon Dioxide Treatments. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1662–1667, 1997.

GILLES, M. et al. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 731–737, 15 mar. 2010.

GONÇALVES, A. H. et al. Atividade fungitóxica in vitro dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. e de seus constituintes majoritários no controle de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1007–1015, 2015.

GOUVEA, A. **Controle em capo e pós-colheita de doenças e metabolismo do morangueiro após tratamento com *Saccharomyces cerevisiae***. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2007.

GREENSHIELDS, M. et al. Fungi Active Microbial Metabolism Detection of *Rhizopus* sp. and *Aspergillus* sp. Section Nigri on Strawberry Using a Set of Chemical Sensors Based on Carbon Nanostructures. **Chemosensors**, v. 4, n. 3, p. 19, 14 set. 2016.

HERCULANO, E. D. et al. Physicochemical and antimicrobial properties of nanoencapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, n. 2, p. 484–491, maio 2015.

HOUGHTON, P. J. et al. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p. 391–400, 4 abr. 2007.

HOYOS, J. M. A. et al. Atividade antifúngica e alterações ultraestruturais em *Pseudocercospora griseola* tratado com óleos essenciais. **Ciênc. agrotec**, v. 36, n. 3, p. 270–284, 2012.

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**, v. 3, p. 12, 25 jan. 2012.

ISHNAVA, K. B.; CHAUHAN, J. B.; BARAD, M. B. Anticariogenic and phytochemical evaluation of *Eucalyptus globules* Labill. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2013.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, n. 8–10, p. 603–608, 12 set. 2000.

JAFARI, S. M. et al. Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816–835, jul. 2008.

KALEMBA, D.; MATLA, M.; SMĘTEK, A. Antimicrobial Activities of Essential Oils. In: **Dietary Phytochemicals and Microbes**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 157–183.

LABINAS, M. A.; CROCOMO, W. B. Effect of java grass (*Cymbopogon winteranus*) essential oil on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1979) (Lepidoptera, Noctuidae). **Acta Scientiarum**, Maringa, v.24, n.5, p.1401-1405, 2002.

LEITE, A. M. et al. **Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v43n1/14.pdf>>. Acesso em: 27 jun. 2019.

LORENZETTI, E. R. et al. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Bras. Pl. Med.**, v. 13, p. 619–627, 2011.

LU, H. et al. Antimicrobial activity of eucalyptus essential oil against *Pseudomonas* in vitro and potential application in refrigerated storage of pork meat. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51, n. 4, p. 994–1001, 1 abr. 2016.

MACIEL, M. V. et al. Atividade inseticida in vitro do óleo de sementes de nim sobre *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet**, v. 19, n. 1, p. 7–11, 2010.

MADAIL, J. C. M. et al. **Avaliação Econômica dos Sistemas de Produção de Morango: Convencional, Integrado e Orgânico** *Comunicado Técnico 181*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/avaliacao_economica_000giwzwdzv02wx5ok05vadr129jqgbk.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2019.

MARELLI, B. et al. Silk Fibroin as Edible Coating for Perishable Food Preservation OPEN. **Scientific Reports - Nature**, v. 6, p. 1–11, 2016.

MARTINS, L.C.S.; KOZUSNY-ANDREANI, D.I.; NAVARRO, R.S. et al. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos sobre cepa de *Candida albicans*. Encontro de Pós-Graduação e Iniciação Científica – Universidade Camilo Castelo Branco, (2013).

MATAR, C. et al. Predicting shelf life gain of fresh strawberries 'Charlotte cv' in modified atmosphere packaging. **Postharvest Biology and Technology**, 2018.

MEILGAARD, M. C.; CARR, B. T.; CIVILLE, G. V. **Sensory evaluation techniques**. [s.l.] Boca Raton: CRC Press, 1999.

MORAES, M. C. B. et al. The chemical volatiles (Semiochemicals) produced by neotropical stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 5, p. 489–505, out. 2008.

MORAIS, L. A. S. **Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/577686/1/2009AA051.pdf>>. Acesso em: 27 jun. 2019.

MUKAI-CORREA, R. et al. Caracterização de Microcápsulas Contendo Caseína e Gordura Vegetal Hidrogenada Obtidas por Gelificação Iônica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 73–80, 2005.

NEETHIRAJAN, S.; JAYAS, D. S. Nanotechnology for the Food and Bioprocessing Industries. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 1, p. 39–47, 19 jan. 2011.

OLIVEIRA, A. V. DE et al. Biocontrole in vitro de *Botrytis cinerea* por Leveduras killer Visando Aplicação em Morangos Pós-colheita. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 13, n. 3, p. 353–364, 2011.

OLIVEIRA, J. DE. **Antifungal activity of essential oils associated with edible coatings for the postharvest control of spoilage fungi in strawberry (*Fragaria spp.*).** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2019.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Sociedade Brasileira de Farmacognosia**, 2010.

PEDROZA-ISLAS, R.; MACÍAS-BRAVO, S.; VERNON-CARTER, E. J. Oil Thermo-oxidate stability and surface oil determination of biopolymer microcapsules. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 1, n. 1–2, p. 37–44, 2002.

PERDONES, A. et al. Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, v. 70, p. 32–41, 1 ago. 2012.

PERETTO, G. et al. Increasing strawberry shelf-life with carvacrol and methyl cinnamate antimicrobial vapors released from edible films. **Postharvest Biology and Technology**, v. 89, p. 11–18, 1 mar. 2014.

PERRICONE, M. et al. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 76, 9 fev. 2015.

PETRICCIONE, M. et al. Effect of Chitosan Coating on the Postharvest Quality and Antioxidant Enzyme System Response of Strawberry Fruit during Cold Storage. **Foods**, v. 4, n. 4, p. 501–523, 29 set. 2015.

PIATI, A.; SCHENEIDER, C. F.; NOZAKI, M. H. Efeito in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre o crescimento e desenvolvimento de *Penicillium sp.* **Semina Ciências Agrárias**, v. 32, n. 3, p. 1033–1040, 2011.

PINO, J. A. et al. Study of essential oils of *Eucalyptus resinifera* Smith, *E. tereticornis* Smith and *Corymbia maculata* (Hook.) K. D. Hill & L. A. S. Johnson, grown in Cuba. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–4, 1 jan. 2002.

PLAZA, P. et al. Evaluation of the potential of commercial post-harvest application of essential oils to control citrus decay. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 79, n. 6, p. 935–940, 2015.

POLK, A. et al. Controlled Release of Albumin from Chitosan-Alginate Microcapsules. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, n. 2, p. 178–185, 1 fev. 1994.

PRAKASH, B. et al. **Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges** *Food Control*, 2015.

PRAKASH, B. et al. **Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system** *Food Control*, 2018.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J. T. Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 405–424, 2012.

REINECCIUS, G. A. et al. **Developments in gum acacias for the encapsulation of flavors**. [s.l.] American Chemical Society, 1995. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9634933>>. Acesso em: 19 jun. 2019.

RIBEIRO, I. P. et al. **Avaliação de estrutura mista de proteção para microencapsulação de ômega-3**. Campinas: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areadoinstituto/ciiciac/resumo2014/RE14203.pdf>>. Acesso em: 13 jun. 2019.

RODRIGUES, E. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto in vitro e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Scientiarum**, v. 28, n. 1, p. 1–5, 2006.

RUBINSTEIN, J. **Fragaria xananassa: Past, Present and Future Production of the Modern Strawberry**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://conservancy.umn.edu/bitstream/handle/11299/175838/Jared_Rubinstein_-_Strawberry.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 17 jun. 2019.

SAFAEI-GHOMI, J.; AHD, A. A. Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens* and *Eucalyptus intertexta*. **Pharmacognosy magazine**, v. 6, n. 23, p. 172–175, jul. 2010.

SEIXAS, P. T. L. et al. Fungitoxic activity of essential oil of citronella grass (*Cymbopogon nardus* L.) and compound citronellal. **Rev Bras Pl Med**, v. 13, p. 523–526, 2011.

SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais de Espécies de Piper Sobre *Crinipellis perniciosus*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatol. Bras**, v. 32, n. 2, p. 143–145, 2007.

SILVA, J.; ROZWALKA, L.C.; MAY DE MIO, L.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* agente etiológico da podridão-da-uva-madura. 45º **Congresso Brasileiro de Fitopatologia** - Manaus, AM, 2012.

SILVA, E. C. **Microencapsulação de extrato de pequi rico em polifenóis: influência das variáveis do processo e do tipo de material de parede sobre a qualidade do produto em pó**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2013.

SIMKO, I.; PIEPHO, H.-P. The Area Under the Disease Progress Stairs: Calculation, Advantage, and Application. **Analytical and Theoretical Plant Pathology**, v. 102, n. 4, p. 381–389, 2012.

SINGLETON, V. L. Citation classic-colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Current Contents/ Agriculture Biology & environmental Sciences**, v. 48, p. 18–18, 1985.

SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. **The preservation and maintenance of living fungi**. [s.l.] CAB INTERNATIONAL, 1994.

SOUZA, E. L. et al. Inhibitory Action of Some Essential Oils and Phytochemicals on the Growth of Various Moulds Isolated From Foods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 2, p. 245–250, 2005.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) powder produced by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 88, n. 3, p. 411–418, 1 out. 2008.

VENTUROSIO, L. R. et al. **Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos** *Summa Phytopathologica*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/sp/v37n1/v37n1a03.pdf>>. Acesso em: 30 jun. 2019.

VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid Genetic Identification and Mapping of Enzymatically Amplified Ribosomal DNA from Several *Cryptococcus* Species. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 172, p. 4238–4246, 1990.

WALL, M. M. et al. Influence of packaging on quality retention of longas (*Dimocarpus longan*) under constant and fluctuating postharvest temperatures. **American Society for Horticultural Science**, v. 46, n. 6, p. 917–923, 2011.

WILCKEN, C. F. et al. **Guia Prático de Manejo de Plantações de Eucalipto**. Botucatu: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.iandebo.com.br/pdf/plantioeucalipto.pdf>>. Acesso em: 17 jun. 2019.

YANG, S. et al. Effects of poplar buds as an alternative to propolis on postharvest diseases control of strawberry fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 6, p. 2136–2141, 1 abr. 2016.

ANEXO

Ficha de análise sensorial

Nome: _____ Idade: _____ Sexo: () F () M Data: _____

Teste de Diferença do Controle - Instruções

Você está recebendo uma amostra Padrão (P) e mais 3 amostras codificadas com número de 3 dígitos.

Em primeiro observe a amostra Padrão (P) para os atributos: cor de morango, aroma de morango, aparência e diferença sensorial geral.

Compare cada amostra codificada com a amostra Padrão (P) para os atributos: Cor de morango, aroma de morango, aparência e diferença sensorial geral. Você irá comparar todas as amostras com o Padrão (P). Por favor avaliar as amostras posicionadas da esquerda para a direita.

Anote na tabela o grau de diferença entre a amostra Padrão (P) e as amostras codificadas de acordo com a escala:

0 = nenhuma diferença da amostra Padrão (P)

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9

10 = extremamente diferente da amostra Padrão (P)

Código da amostra	Valor de 0 a 10 de acordo com a escala acima			
	Cor de morango	Aroma de morango	Aparência	Diferença sensorial geral

Lembre-se de que há uma amostra Padrão entre as amostras codificadas.

Comentários: _____

Qual é a sua amostra preferida? _____

Você percebeu aroma diferente ou anormal em alguma amostra? Qual? Você consegue descrever esse aroma?