

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

CRISTIANE RODRIGUES DE ARAÚJO PENNA

DESENVOLVIMENTO DE RECOBRIMENTO DE FRUTA PÃO E
QUITOSANA ASSOCIADA A NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E SUA
APLICAÇÃO NA CONSERVAÇÃO PÓS COLHEITA DO MAMÃO ‘GOLDEN’

João Pessoa

2018

CRISTIANE RODRIGUES DE ARAÚJO PENNA

**DESENVOLVIMENTO DE RECOBRIMENTO DE FRUTA PÃO E
QUITOSANA ASSOCIADA A NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E SUA
APLICAÇÃO NA CONSERVAÇÃO PÓS COLHEITA DO MAMÃO ‘GOLDEN’**

João Pessoa

2018

Cristiane Rodrigues de Araújo Penna

**DESENVOLVIMENTO DE RECOBRIMENTO DE FRUTA PÃO E
QUITOSANA ASSOCIADA A NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E SUA
APLICAÇÃO NA CONSERVAÇÃO PÓS COLHEITA DO MAMÃO “GOLDEN”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Centro de
Tecnologia, da Universidade Federal da Paraíba, em
cumprimento aos requisitos para conclusão de curso.

Orientadora: Profa. Dra. Silvanda de Melo Silva

João Pessoa

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P412d Penna, Cristiane Rodrigues de Araújo.

Desenvolvimento de recobrimento de fruta pão e quitosana associada a nanoemulsão de óleo essencial e sua aplicação na conservação pós colheita do mamão Golden / Cristiane Rodrigues de Araújo Penna. - João Pessoa, 2018.

172 f. : il.

Orientação: Silvanda de Melo Silva.
Tese (Doutorado) - UFPB/CT.

1. Antifúngico. 2. Bicamadas. 3. Carica papaya. 4. Foeniculum vulgare Mil. 5. Metabolismo enzimático. I. Silva, Silvanda de Melo. II. Título.

UFPB/BC

CDU 661.163.2(043)

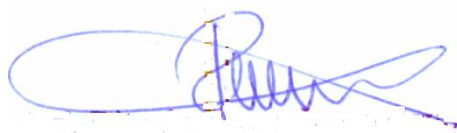
Cristiane Rodrigues de Araújo Penna

**DESENVOLVIMENTO DE RECOBRIMENTO DE FRUTA PÃO E
QUITOSANA ASSOCIADA A NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E SUA
APLICAÇÃO NA CONSERVAÇÃO PÓS COLHEITA DO MAMÃO “GOLDEN”**

Banca Examinadora



Prof. Dra. Silvana, de Melo Silva
Presidente da Banca



Prof. Dra. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga
Membro Interno



Prof. Dra. Adriana Ferreira dos Santos
Membro Externo



Prof. Dra. Rejane Maria Nunes Mendonça
Membro Externo



Prof. Dr. Walter Esfrain Pereira
Membro Externo

A Deus por conceder a realização deste sonho.

A meu marido, mãe e irmãos. Esta vitória é para vocês.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder pelo dom da vida, esta vitória e por não me desampara em momento nenhum;

A meu marido Paulo Henrique, por esta sempre comigo em todos os momentos me apoiando e vivendo esta jornada;

A minha mãe Edleuza pelo amor, carinho e orações em todas as fases da minha vida, aos meus irmãos Viviane e Marcos por sempre torcerem e esatarem do meu lado;

A minha orientadora Prof. Dr. Silvanda, da Silva Melo, por não me deixar desistir e esta sempre me incentivando a correr atrás dos meus sonhos;

A toda família (equipe) do Laboratório de Tecnologia e Biologia Pós Colheita (LBTPC), pelos momentos vividos e por terem feito parte da concretização deste sonho;

As minhas amigas de Ana Carla, Diana, Rosilda e Paula por sempre me apoiarem e estarem presentes em todos os momentos da minha vida, inclusive durante o doutorado;

Ao CERTEBIO pelas análises de DRX, FTIR e MEV executadas nos filmes bicamadas

Ao LAPOA por disponibilizar o uso do equipamento para utilização no meu experimento;

Ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFPB e a todos os docentes que tive o prazer de conviver;

À CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo e pelo financiamento;

A todos que contribuíram de forma indireta ou direta para que este sonho se realizasse.

Muito obrigada

RESUMO

Desenvolvimento de recobrimento de fruta pão e quitosana associada à nanoemulsão de óleo essencial e sua aplicação na conservação pós-colheita do mamão ‘Golden’

A utilização de recobrimentos biodegradáveis tem sido considerada como uma alternativa promissora para conservação pós-colheita de frutos. Entretanto, estudos voltados na elaboração e aplicação de recobrimentos a base de matérias primas não convencionais associado a nanoemulsão, que efetivamente promova aumento de vida útil pós-colheita de frutos com ação antifúngica ainda são escassos. O objetivo deste estudo foi desenvolver e avaliar as propriedades físicas, físico químicas e o potencial antifúngico de recobrimentos na forma de bicamadas a base de amido de fruta pão (AFP), quitosana (Q), alginato de sódio (AS) e óleo essencial de erva doce (OEED) e sua influência na conservação pós colheita de mamão da cultivar Golden. O estudo foi conduzido em três etapas: na primeira etapa foi realizada a extração do amido de fruta pão, de frutos colhidos em dois estádios de maturação (imaturo e maduro). O amido foi avaliado quanto as suas características químicas e propriedades funcionais. Frutos maduros apresentaram maiores rendimentos na extração de amido (80.02%), amilose (51.93%) e amilopectina (28.19%), com grau de gelatinização a 90°C, assim, este foi utilizado na elaboração dos recobrimentos em bicamadas. A segunda etapa foi elaborada através de planejamento experimental, para formulação das bicamadas, avaliadas as variáveis dependentes quanto a suas características físicas, físico químicas (permeabilidade, opacidade, solubilidade, cor, espessura), antifúngicas (*Colletotrichum gleosporioides*). As formulações de bicamadas com 2.0% de AFP, 0.25; 0.43 e 0.50% de OEED, 0.0; 0.50; 0.85% de Q e 0.50% de AS, apresentaram propriedades físico-químicas e antifúngicas superiores. Portanto, na terceira etapa, estas formulações também foram avaliadas quanto a difração de Raio X, Espectrometria de Absorção na região Infravermelho com Transformada de Fourier, Microscopia Eletrônica de varredura e foram aplicadas em frutos de mamoeiro da variedade Golden, para avaliação durante 12 dias consecutivos sob a condição ambiente (24±2°C e 75% UR). Na aplicação das bicamadas nos frutos, foi aplicada a primeira camada, logo, após completa secagem nos frutos, foi aplicada a segunda camada. Também foi utilizada a formulação controle, na qual não havia aplicação de recobrimentos. A cada dois dias foram retiradas quatro parcelas para determinações físico-químicas, compostos biotivos, atividade enzimática, e avaliações sensoriais e todos os dias a perda de massa e atividade respiratória. Recobrimento em bicamada foi efetivo em retardar a maturação e inibir o crescimento de fungos em mamão Golden e, conseqüentemente, o manter seu potencial funcional, principalmente em frutos recobertos com a bicamada composta de 0.50% de nanoparticulados de OEED e AS e 2% de AFP com 0.50% de Q, que mantiveram a qualidade dos frutos em pelo menos doze dias na condição ambiente.

Palavras-chaves: Antifúngico, Carica papaya, Bicamadas, *Foeniculum vulgare* Mil e Metabolismo enzimático.

ABSTRACT

Development of breadfruit and chitosan coating associated with essential oil nanoemulsion and its application in postharvest conservation of ‘Golden’ papaya

The use of biodegradable coatings has been considered as a promising alternative for postharvest fruit conservation. However, studies aimed at the elaboration and application of coatings based on unconventional raw materials associated with nanoemulsion, which effectively promote an increase in the postharvest useful life of fruits with antifungal action are still scarce. The objective of this study was to develop and evaluate the physical, physicochemical and antifungal potential of coatings in the form of bilayers based on breadfruit starch (BFS), chitosan (C), sodium alginate (SA) and fennel essential oil (FEO) and its influence on postharvest conservation of Golden papaya cultivar. The study was carried out in three stages: in the first stage, the extraction of breadfruit starch from fruits harvested at two maturity stages (immature and ripe) was carried out. Starch was evaluated for its chemical characteristics and functional properties. Ripe fruits showed higher yields in the extraction of starch (80.02%), amylose (51.93%) and amylopectin (28.19%), with a degree of gelatinization at 90°C, thus, this was used in the preparation of coatings in bilayers. The second stage was elaborated through experimental planning, for the formulation of the bilayers, evaluating the dependent variables regarding their physical, physicochemical (permeability, opacity, solubility, color, thickness), antifungal (*Colletotrichum gleosporioides*) characteristics. The bilayer formulations with 2.0% BFS, 0.25; 0.43 and 0.50% FEO, 0.0; 0.50; 0.85% of C and 0.50% SA showed superior physicochemical and antifungal properties. Therefore, in the third step, these formulations were also evaluated for X-ray diffraction, Absorption Spectrometry in the Infrared region with Fourier Transform, Scanning Electron Microscopy and also were applied to Golden cultivar papaya fruits, for evaluation during 12 consecutive days, under room condition (24±2°C e 75% RH). For the application of the bilayers on the fruits, the first layer was applied, then, after complete drying, the second layer was applied. The control formulation was also used, in which there was no application of coatings. Every two days, four plots were taken for physicochemical determinations, bioactive compounds, enzymatic activity, and sensory evaluations, and every day for mass loss and respiratory activity. Bilayer coating was effective in delaying the maturation and inhibiting fungal growth in Golden papaya and, consequently, maintaining its functional potential, especially in fruits coated with the bilayer composed of 0.50% FEO nanoparticles and SA and 2% BFS with 0.50% C, which maintained fruit quality in at least twelve days under room conditions.

Keywords: Antifungal, *Carica papaya*, Bilayers, *Foeniculum vulgare* Mil and Enzymatic Metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. (A) Meio de cultura BDA com inoculo de <i>Colletotrichum gleosporioides</i> , (B), Microscopia de <i>Colletotrichum gleosporioides</i> , fruto infeccionado (C) ambos após sete dias de incubação a 25°C.....	20
Figura 2. Aplicação de duas camadas: ácido oleico, seguido de quitosana em citrus.....	26
Figura 3. Aplicação de bicamadas em melancia minimamente processada, composta por camadas de lactato de cálcio, alginato de sódio, lactato de cálcio, pectina e por fim lactato de cálcio.....	27
Figura 4. Etapas do processo de extração do amido de fruta pão (A) descascamento do fruto, (B) polpa cortada em pedaços, (C) trituração e (D) filtragem.....	35
Figura 5. Fluxograma de elaboração das bicamadas com matérias primas biodegradáveis.....	40
Figura 6. Elaboração das nanoemulsões a partir de alginato de sódio, Tween 40 e concentrações de óleo essencial de erva doce, aplicação de Ultra Turax a 15000 rpm por 3 minutos (A), Ultrassom a 90% de amplitude por 5 minutos; da esquerda para direita nanoemulsões prontas 0,07%; 0,25%; 0,43% e 0,5% de óleo essencial de erva doce (OEED); Micrografias em microscópio eletrônico 1000x da nanoemulsão a 0,5% OEED.....	42
PATENTE	
Figura 1.	84
Figura 2.	85
Figura 3 e 4.	86
Figura 5.	87
ARTIGO 1	
Figura 1. Perda de massa (A) e firmeza (B) em mamão ‘Golden’ recoberto com bicamada. A camada superior com teor fixo de alginato de sódio (0.5%) como matriz e diferentes teores de óleo essencial (EO) de erva doce incorporado como nanoemulsulsão, que foi, sequencialmente, depositada na camada inferior, com teor fixo de amido de fruta pão	96

(2.0%) como matriz e diferentes teores de quitosana (C), com % nas camadas (superior + inferior): (0.43EO + 0.85C); (0.50 EO + 0.50C); (0.25 EO + 0.50C); (0.25 EO + 0.00C) e controle (mamões sem recobrimento), durante 12 dias na condição ambiente ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$ e 75% UR). n=4.....

Figura 2. Índice de cor (A), sólidos solúveis (SS (B)), acidez titulável (AT(C)) e SS/AT (D) em mamão ‘Golden’ com bicamada. A camada superior com teor fixo de alginato de sódio (0.5%) como matriz e diferentes teores de óleo essencial (EO) de erva doce incorporado como nanoemulsão, que foi depositada na camada inferior, com teor fixo de amido de fruta pão (2.0%) como matriz e diferentes teores de quitosana (C), com % nas camadas (superior + inferior): (0.43EO + 0.85C), (0.50 EO + 0.50C), (0.25 EO + 0.50C), (0.25 EO + 0.00C), e controle (sem recobrimento), durante 12 dias na condição ambiente ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$ e 75% UR). n=4..... 97

Figura 3. Intensidades de odor (A) e sabor característicos (B) e sabor doce (C) em mamão ‘Golden’ recoberto com bicamada. A camada superior com teor fixo de alginato de sódio (0.5%) como matriz e diferentes teores de óleo essencial (EO) de erva doce como nanoemulsão, e depositada na camada inferior, com teor fixo de amido de fruta pão (2.0%) como matriz e diferentes teores de quitosana (C), com % nas camadas (superior + inferior): (0.43EO + 0.85C), (0.50 EO + 0.50C), (0.25 EO + 0.50C), (0.25 EO + 0.00C), e controle (sem bicamada), por 12 dias na condição ambiente ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$ e 75% UR). n=4..... 99

Figura 4. Danos Limitantes (A), Intensão de Compra (B) Aceitação Global (A) em mamão ‘Golden’ recoberto com bicamada. A camada superior com teor fixo de alginato de sódio (0.5%) como matriz e diferentes teores de óleo essencial (EO) de erva doce como nanoemulsão, sobreposta na camada inferior, com teor fixo de amido de fruta pão (2.0%) como matriz e diferentes teores de quitosana (C), com % nas camadas (superior + inferior): (0.43EO + 0.85C); (0.50 EO + 0.50C); (0.25 EO + 0.50C); (0.25 EO + 0.00C) e controle (sem bicamada), por 12 dias na condição ambiente ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$ e 75% UR). n=4..... 102

Figura 5. Biplot baseado nos autovetores das características físico-químicas e sensoriais e nos scores de mamão ‘Golden’ com bicamadas no 12º dia na condição ambiente ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$ e 75% UR). A camada superior com teor fixo de alginato (A) de sódio (0.5%) e diferentes teores de óleo essencial de erva doce (EO) como nanoemulsão, depositada na camada inferior, com teor fixo de amido de fruta pão (2.0%) e diferentes teores de quitosana (C), com % nas camadas (superior + inferior): (0.43EO + 0.85C), (0.50 EO + 0.50C), (0.25 EO + 0.50C), (0.25 EO + 0.00C), e controle (frutos sem bicamada)..... 104

ARTIGO 2

Figure 1. Changes in the bread fruit starch granules during heating at temperatures of 20°C (A), 40°C (B), 60°C (C), 70°C (D), 80°C (E), until total gelatinization at 90°C (F), solubility index (G), and swelling power (H)..... 120

Figure 2. Images of the film of sodium alginate (0.50%) in combination with dispersion of fennel essential oil at concentrations of 0.07% (A), 0.25% (B), 0.43% (C) and 0.50% (D) as nanodispersion..... 121

Figure 3. Inhibition (%) of growth of *C. gleosporioides* submitted to culture medium enriched with nanoemulsion of fennel essential oil in bilayer coatings, at three (A), six (B) and nine days (C) of incubation, In combinations with different levels of nanoemulsion of fennel essential oil in the first layer and breadfruit starch (2%) and different levels of 127

chitosan in the second layer *in vitro*.....

Figure 4. Growth of *C. gleosporioides* in Petri dishes in culture medium enriched with different formulations of bilayer coatings for 09 days storage under temperature $22\pm2.0^{\circ}\text{C}$. (A) Formulations shown growth of *C. gleosporioides*. 9B) Formulations in which the growth of *C. gleosporioides* was inhibited. $n=4$ 129

Figure 5. Dispersion of the physicochemical and microbial variables and formation of groups of the formulations based on the scores of the first and second principal components..... 131

Figure 6. Absorption Spectrometry in the Fourier Transform Infrared (FTIR) region of bilayer coatings..... 133

Figure 7. Crystallographic analysis by dispersive X-ray spectroscopy of the bilayer coatings..... 134

Figure 8. Scanning electron micrograph, with 750x magnification for first layer 0.5A 0.43EO (A); 0.5A 0.50EO (B); 0.5A 0.25EO (C) and 0.5A 0.25EO (D); second layer (2S 0.85C (E); 2S 0.50 (F); 2S 0.00C (G) and 2S 0.50C (H).) Cross section with 1500x magnification corresponding to bilayer coatings (0.5A 0.43EO) + (2S 0.85C) (0.5A 0.25EO) + (2S 0.50E) + (2S 0.50C) (J): (0.5A 0.25EO) + (2S, 0C) (K) and L)..... 136

ARTIGO 3

Figure 1. Ascorbic acid (A), yellow flavonoids (B), lycopene (C) and β -carotene (D) in Golden papaya coated with a bilayer composed of combinations of sodium alginate 0.5% (A) added of different levels of nanoemulsion of fennel essential oil (EO) in the first layer plus breadfruit starch 2% (S) added of different levels of quitosna (C) in the second layer, and the control (without coatings), during storage at room conditions ($24 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ and $75 \pm 3\%$ RH) during 12 days..... 154

Figure 2. Total Extractable Polyphenol (A) and antioxidant activity by DPPH^{-1} (EC50) (B) e by ABTS (C) radicals in Golden papaya coated with a bilayer composed of combinations of sodium alginate 0.5% (A) added of different levels of nanoemulsion of fennel essential oil (EO) in the first layer plus breadfruit starch 2% (S) added of different levels of quitosna (C) in the second layer, and the control (without coatings), during storage at room conditions ($24 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ and $75 \pm 3\%$ RH) during 12 days..... 155

Figure 3. Levels of hydrogen peroxide (A), and activities of ascorbate peroxidase (B), superoxide dismutase (C), and Catalase (D) in Golden papaya coated with a bilayer composed of combinations of sodium alginate 0.5% (A) added of different levels of nanoemulsion of fennel essential oil (EO) in the first layer plus breadfruit starch 2% (S) added of different levels of quitosna (C) in the second layer, and the control (without coatings), during storage at room conditions ($24 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ and $75 \pm 3\%$ RH) during 12 days..... 157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações utilizadas para construção da matriz do planejamento experimental.....	37
Tabela 2. Matriz de planejamento 2 ² níveis codificados e decodificados das variáveis, para obtenção de recobrimentos.....	38
 ARTIGO 1	
Table 1. Tempo para atingir o pico climatérico e produção de CO ₂ sob a condição ambiente (24 ± 2°C e 74 ± 2% RH) de mamão ‘Golden’ recoberto com bicamada. A camada superior com teor fixo de alginato de sódio (0.5%) como matriz e diferentes teores de óleo essencial (EO) de erva doce incorporado como nanoemulsão, que foi, sequencialmente, depositada na camada inferior, com teor fixo de amido de fruta pão (2.0%) como matriz e diferentes teores de quitosana (C), com % nas camadas (superior + inferior): (0.43EO + 0.85C); (0.50 EO + 0.50C); (0.25 EO + 0.50C); (0.25 EO + 0.00C) e controle (mamões sem recobrimento).....	95
 ARTIGO 2	
Table 1. Pulp yield and chemical composition of breadfruit in two maturity stages.....	118
Table 2. Water vapor permeability, solubility, thickness, opacity, color <i>l</i> , <i>a</i> , <i>b</i> and ΔE of formulations of a bilayer coating of sodium alginate (0.5%) in combinations with different levels of nanoemulsion of fennel essential oil in the first layer and bread fruit starch (2%) and different levels of chitosan in the second layer.....	123
Table 3. Spore production and mycelial growth rate index (IVCM) in formulations of a bilayer coating of sodium alginate (0.5%) in combinations with different levels of nanoemulsion of fennel essential oil in the first layer and bread fruit starch (2%) and different levels of chitosan in the second layer <i>in vitro</i>	123
 ARTIGO 3	
Table 1. Independent variables and degree of severity to <i>C. gleosporioides</i> (dependent) of golden papaya fruits coated with a bilayer composed of combinations of sodium alginate added different levels of nanoemulsion of fennel essential oil in the first layer plus breadfruit starch 2% added of different levels of quitosna in the second layer and control (without coatings).....	159

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ACP	Análise de componentes principais
AFP	Fruta Pão
APX	Ascobarto Peroxidase
BDA	Batata Dextrose Ágar
CAT	Catalase
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CO ₂	Dióxido de Carbono
DCCR	Delineamento Compostos Central Rotacional
DPPH	1,1'-diphenil-2-picrilhidrazil
DFI	2,6- dicloro-Fenol- indofenol
DRX	Difratograma de Raio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
H ₂ O ₂	Peroxido de hidrogênio
MF	Massa fresca
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mm	Milímetro
mmol	Micromol
O ₂	Oxigênio
OE	Óleo essencial
ppm	Parte por milhão
rpm	Rotação por minuto
UFC	Unidade formadora de colônia
UR	Umidade Relativa
%	Percentual
α	Alfa
Δ	Delta

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	17
2.REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	19
2.1. Perdas Pós – Colheita: Antracnose em mamão.....	19
2.2. Características Metabólicas do Mamão (<i>Carica papaya L.</i>).....	21
2.3. Recobrimentos Biodegradáveis.....	23
2.4. Bicamadas Biodegradáveis.....	26
2.5. Nanoemulsões.....	28
2.6. Amido de Fruta Pão - (<i>Artocarpus altilis</i>).....	29
2.7 Óleo Essencial de Erva Doce (<i>Foeniculum vulgare Mill.</i>).....	31
2.8 Quitosana.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Material.....	33
3.2 Métodos.....	34
3.3. Etapa I - Obtenção e Caracterização do Amido de Fruta Pão.....	34
3.3.1. Método de extração do amido e Composição centesimal do amido extraído da fruta pão.....	35
3.3.2. Amido Total, Amilose e Amilopectina.....	35
3.3.3 Poder de inchamento e índice de solubilidade do Amido de Fruta Pão (<i>Artocarpus altilis</i>).....	36
3.3.4. Morfologia dos Grânulos do amido de fruta pão.....	36
3.4 Etapa II: Caracterização Microbiológica e Físico Química dos Recobrimentos Bicamadas.....	37
3.4.1 Planejamento Experimental.....	37
3.4.2. Preparo do Inóculo do <i>C. gloeosporioides</i>	38
3.4.3. Percentual de Inibição do <i>C. gloeosporioides</i> , Índice de velocidade do Crescimento Micelial e Contagem de esporos – Câmara de Neubauer.....	
3.4.4. Captura de Imagem do Fungo <i>C. gloeosporioides</i>	39
3.4.5. Determinação do índice de proteção das bicamadas ao Mamão Golden.....	39
3.4.6. Elaboração das multicamadas.....	39
3.4.7. Avaliação das propriedades funcionais das multicamadas.....	42
3.5 Etapas III: Avaliação dos Parâmetros da Qualidade do Mamão “Golden” Recobertos com as Bicamadas.....	45
3.5.1. Avaliações Físicas.....	45

3.5.2. Qualidade Funcional.....	46
3.5.3. Análise de enzimas.....	48
3.5.4. Análise sensorial.....	49
3.6. Analise Estatística.....	49
4.0. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	50
5.0. RESULTADOS.....	66
Patente: Processo e Produto em Multicamadas Biodegradáveis Com Ação Funcional na Conservação e Qualidade Pós Colheita de Frutos.....	67
Artigo 1: : Breadfruit Starch and Chitosan with Nanoemulsion of Essential Oil Enhances the Postharvest Life of Papaya.....	89
Artigo 2: Properties of a biodegradable polymer bilayer coating based on breadfruit starch, chitosan and nanodispersion of fennel essential oil.....	109
Artigo 3: Efeito das bicamadas a base de amido de fruta pão e nanoemulsão de óleo essencial de erva doce, sobre a atividade funcional do mamão “Golden”.....	145
Considerações Finais.....	173
Apêndice I.....	174

1. Introdução

O uso de matérias primas regionais para o desenvolvimento de filmes e recobrimentos biodegradáveis e comestíveis surge como uma inovação tecnológica aos materiais derivados do petróleo para a manutenção da qualidade e aumento da vida útil pós colheita frutos e hortaliças, de forma segura e sustentável (MARAN, et al, 2013). Esta inovação tecnológica, atende as demandas correntes do consumidor que apresenta crescente preocupação com a segurança alimentar e demanda por alimentos sem a presença de substâncias sintéticas potencialmente nocivas a saúde. A exemplo disso, países importadores de frutos e hortaliças apresentam normas e protocolos rigorosos quanto aos limites máximos de resíduos de agrotóxicos, mas também do risco microbiano nesses produtos (MAVUSO; VAN NIEKERK, 2013).

Diversas matérias primas amiláceas têm sido usadas para na elaboração de recobrimentos, a exemplo da mandioca (LIMA et al., 2016), inhame (SILVA, 2016) e jaca (RODRIGUES et al., 2018). Neste contexto, a fruta-pão (*Artocarpus altilis*), fruto de polpa amilácea é amplamente consumida no Pacífico Sul na forma da polpa cozida, frita ou assada, sendo também utilizada como matéria prima para elaboração de novos produtos: cookies, pães e farinhas (MA et al., 2012). As matrizes geleificadas destes materiais permitem a inserção de ingredientes ativos ou substâncias com potencial de controle de fungos. Portanto, é possível inferir que o amido presente na fruta pão pode apresentar propriedades adequadas para a preparação de recobrimentos.

O óleo essencial de erva doce (*F. vulgare*) é reconhecido como uma fonte de compostos com atividade antifúngicos com concentração relativa ao componente anetol (DIAAZ-MAROTO et al., 2006; BARAZANI et al. 2002). Oléo essencial de erva-doce tem sido utilizado em recobrimentos para controle de doenças em manga (LIMA et al., 2012; AZEREDO et al., 2016). Entretanto, o contato direto de óleos essenciais com a superfície de frutos pode resultar em desordens fisiológicas no fruto, comprometendo a qualidade e reduzindo a vida útil pós-colheita, principalmente quando utilizado em doses elevadas.

O uso de óleos essenciais na elaboração de filmes biodegradáveis, apresenta diversas funções como: antifúngico, antibacteriano e antioxidante. A presença de substâncias ativas em sua composição e sua elevada atividade antimicrobiana permite sua aplicação em baixas doses. Além de ser também benéfico na proteção de plantas como inseticidas, fungicidas e bactericidas naturais, os mesmos podem ser apresentar

extremamente nocivos na superfície dos frutos, causando depreciações e injúrias nas cascas dos frutos, a exemplo, o óleo essencial de erva doce. No entanto, seu uso e forma de aplicação, pode provocar modificações indesejáveis aos frutos. O uso de óleos essenciais na forma de nanoemulsão, que é um método que retém e conserva todos os componentes ativos do óleo sem degradá-los, podendo prevenir possíveis danos aos frutos. A utilização da solução filmogênica de alginato de sódio como matriz base polimérica e óleo essencial de erva doce, proporciona estabilidade física das nanoemulsões.

Para maximizar os efeitos da nanomulsão, esta pode ser aplicada em multicamadas. A técnica de deposição eletrostática camada-por-camada ou multicamada se originou na ciência dos materiais e tem uma ampla gama de aplicações (GOMES et al., 2011). A técnica de aplicação de recobrimentos/filmes em frutos pela disposição polieletrólitos de cargas opostas, conhecendo como camada por camada é uma forma de potencializar o efeito de filmes obtidos por estas materiais primas.

Os recobrimentos biodegradáveis apresentam-se como uma tecnologia pós-colheita promissora para mamão. Este fruto, por ser climatérico apresenta rápido amadurecimentos e suscetibilidade ao biótico e estresses abióticos (ZHU et al., 2013). A sua elevada taxa respiratória acelera o metabolismo e antecipa a senescência, resultando assim a senescência em curta vida útil pós colheita. O retardo do amadurecimento é um fator importante para ampliar o tempo de exposição deste fruto. Adicionalmente, o mamão é susceptível à antracnose, causada pelo *Colletotrichum gloeosporioides* (ONG et al., 2013), uma das principais doenças neste fruto, causadoras de elevadas perdas pós-colheita.

Dentre as alternativas que podem ser utilizadas para inibir o desenvolvimento fúngico, bem como, aumentar a vida útil pós colheita de frutas, estão o uso de recobrimentos. A utilização de amido de origem não convencional, como amido de fruta pão, é uma das matérias primas com características geleificantes, que propicia a formação de filmes com propriedades de barreira a gás e a umidade. Como forma de potencializar as propriedades de barreira, nas características físicas dos filmes, a implementação da quitosana, (matéria prima oriunda da desacetilação da quitina presente na carapaça de crustáceos) é essencial para formar filmes mais resistentes, com boas propriedades mecânicas, além de proporcionar efeito antifúngico em baixas doses. Estes dois polissacarídeos utilizados de forma conjunta, podem resultar

em filmes/recobrimentos que podem agir sinergisticamente no retardo da maturação, sem provocar respiração anaeróbica ou estresse aos frutos. Além destas duas matérias primas biodegradáveis, outro polissacarídeo utilizado é o alginato de sódio, derivado de algas, que também apresenta boas propriedades para formação de filmes, sendo utilizado como espessante ou emulsionante. O alginato, portanto, pode ser utilizado para a dispersão do óleo essencial, minimizando as possíveis desordens fisiológicas que poderiam ocorrer pela aplicação direta no fruto, promovendo o aumento da vida pós colheita, pelo do retardo do amadurecimento e controle de doenças, sem comprometer a qualidade do fruto.

Com isso, o objetivo deste trabalho foi desenvolver, avaliar as propriedades física, físicoquímicas e efeitos fungistático de filmes de amido de fruta pão, quitosana e nanopartículas de óleo essencial de erva doce em bicamadas e sua ação na conservação pós colheita de mamão.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Perdas Pós – Colheita: Antracnose em Mamão

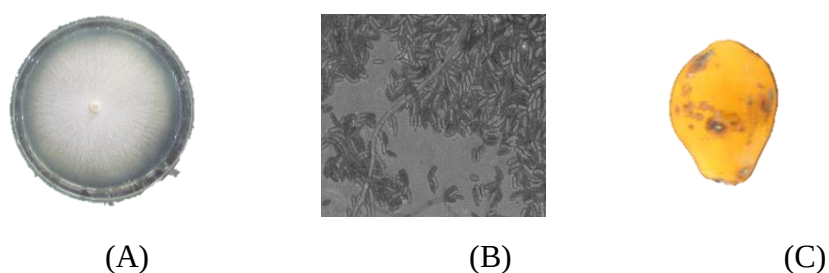
A necessidade de implementar tecnologias que vise uma maior vida pós colheita do mamão é necessário para manter por maiores períodos frutos com qualidade. Por ser um fruto extremamente perecível e por apresentar suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças pós colheita, o mamão, se torna um fruto frágil. As principais causas das perdas dos frutos são perdas mecânicas, injúria pelo frio, doenças pós colheita, e perdas devido ao avançado estágio de maturação (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2013).

A antracnose é uma típica doença pós colheita que atinge frutos, através do fungo *Colletotrichum sp*, que é um gênero que comporta uma série de espécies fungicas, causando doenças em vegetais de diversas regiões tropicais e subtropicais. Quase toda cultura é susceptível a uma ou mais espécies *Colletotrichum*. Este gênero é considerado o oitavo grupo mais importante dentre os fungos fitopatogênicos no mundo (DEAN et al., 2012). E de acordo com O'Connell et al, (2012), este fungo compreende cerca de 600 espécies, que age sobre infecção no hospedeiro vivo (biotrofia) e destruição do tecido vegetal (necrotrofia). A taxonomia do *Colletotrichum* foi revisada, e espécies foram incluída neste gênero (CANNON et al., 2012), e foram identificadas utilizando

morfologia e características culturais, juntamente com hospedeiro e distribuição geográfica (DAMM et al., 2012; WEIR et al., 2012).

Para entender o comportamento do *Colletotrichum* é necessário compreender a etiológica da doença, para desenvolvimento de estratégias de controle da antracnose. As infecções fúngicas ocorrem quando os conídios são difundidos por irrigação, pelo ar ou durante precipitação em frutas saudáveis; com condições favoráveis para seu desenvolvimento, como elevada umidade e temperaturas elevadas, condição comum de regiões tropicais e subtropicais, este patógeno tem plena condição de se desenvolver rapidamente, sobre a superfície das frutas, onde, começam a germinar e penetram na epiderme, colonizando o tecido do fruto (PRUSKY; LICHTER, 2007), esse processo de infecção, aderi à superfície do hospedeiro através de tubo germinativo e depois coloniza o tecido do hospedeiro (ARAUJO; STADNIK, 2011).

Figura 1. (A) Meio de cultura BDA com inoculo de *Colletotrichum gleosporioides*, (B), Microscopia de *Colletotrichum gleosporioides*, fruto infeccionado (C) ambos após sete dia de incubação a 25°C. **Fonte:** autoral



Neste contexto, dentre as doenças pós colheita que atingem o mamão, a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Figura 3), que em elevadas temperaturas e alta umidade (condições essenciais para o desenvolvimento do fungo) causa danos irreversíveis em frutos (BAUTISTA- BAÑOS et al., 2013). Certos patógenos induzem doenças com sucesso por meio de sua capacidade de contrapor as respostas da defesa das plantas. A susceptibilidade dos órgãos das plantas, particularmente frutas e flores, a uma invasão, de microrganismos aumentam com o envelhecimento e o amadurecimento (HARTUNG, 2010). O *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causador da antracnose em mamões, produz ácido indol-3-acético, a partir do triptofano. Este fungo é conhecido por produzir este ácido em plantas, que em altas concentrações inibem a expressão de moléculas de defesa de plantas (ROBINSON; RIOV, 1998; MAOR; HASKIN; LEVI-KEDMI, 2004).

Os sintomas mais comuns que ocorrem nos frutos atacados pela antracnose é a depressão circular, presença de massa alaranjada de esporos, estes sintomas podem ainda variar de acordo com a espécie do vegetal, bem como, com clima, pois, em condições de clima ameno a quente e épocas chuvosas as perdas podem chegar a 100%. Ainda, estes sintomas podem só evoluir após a colheita, durante o transporte e armazenamento (TOZZE JÚNIOR et al, 2006). Estudos anteriores indicam que *Colletotrichum gloeosporioidese* atingi uma gama de vegetais sobretudo frutos, produzindo perdas irreversíveis na qualidade como em mamão (ONG; ALI, 2015), citrus (ZHOU; ZHANG; ZENG, 2016), manga (XU et al, 2017; HONG et al, 2016; KAMLE et al, 2013), maçã (ROCKENBACH et al, 2015); abacate (CAMPOS-MARTÍNEZ et al, 2016). Mais há em contrapartida pesquisas aplicadas em intervir a ação deste patógeno, bem como, manter a qualidade e aumentar a vida útil de frutas durante a vida pós colheita. São alternativas que lançam mão de métodos específicos.

Os usos de diferentes filmes/recobrimentos comestíveis oferecem muitas vantagens devido à sua compatibilidade, aparência, propriedades antimicrobianas, permeabilidade seletiva aos gases (CO₂ e O₂), boas propriedades mecânicas, não toxicidade, não poluentes e baixo custo, vem sendo cada vez mais uma alternativa viável para manutenção da qualidade de frutas sensíveis a antracnose, (ELSABEE; ABDOL, 2013), além, de reduzir processos metabólicos e retardando o crescimento microbiano, e também pode criar uma barreira protetora para reduzir a taxa de respiração e a transpiração retardando a senescência e preservando a qualidade (ANTUNES et al., 2012; ZÚNIGA et al., 2012; DHALL, 2013; VALENCIA-CHAMORRO et al., 2013; JIMENEZ et al, 2017).

2.2. Características Metabólicas do Mamão (*Carica papaya L.*)

O mamão (*Carica papaya L.*) é uma fruta cultivada nas áreas tropicais e subtropicais (SHARMA, 2015) de grande importância alimentar com potencial de consumo in natura e de produtos industrializados, devido ao seu alto valor nutricional e propriedades funcionais, (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2013; ALI et al., 2014; FUENTES e SANTAMARÍA, 2014). O grupo Solo, no qual se encontra a maioria das cultivares de mamoeiro utilizadas no mundo, são materiais geneticamente uniformes, consistindo de linhagens puras fixadas por sucessivas gerações de autofecundação e que devido à conformação da copa, tamanho de frutos. Dentro deste grupo encontra-se a variedade

Golden (Figura 1), que também apresenta características desejáveis, e de elevada aceitação pelos consumidores (RUGGIERO et al, 2011), que são desenvolvidas durante o processo de amadurecimento, que envolve vários processos bioquímicos que conferem a doçura, aroma agradável, textura macia e cor amarelo – alaranjada. O mamão Golden é um fruto que apresenta uma baga de formato arredondado, cilíndrico, que quando maduro apresenta cor da casca alaranjada. Sua polpa apresenta elevada doçura, maciez acentuada, com sementes alojadas ao centro do fruto (TREVISAN, 2013).

De acordo com Aravind et al (2013), esta fruta é fonte de nutrientes e de micronutrientes como o retinol, tocoferol, vitaminas do complexo B e ácido ascórbico, de minerais como, cálcio, magnésio, potássio e de fibras. Por ter em sua composição a presença de compostos bioativos, esta fruta tem importante atividade antioxidante e seu consumo propicia benefícios para a saúde, particularmente propriedades medicinais e melhor digestão (CHUTICHUDET e CHUTICHUDET, 2014. Ao estudarem a composição química e nutricional em mamão Vij e Prashar (2015), comprovaram que o mesmo pode ser considerado alimento com propriedades funcionais nutraceuticas e identificaram os constituintes em 100g de mamão maduro: energia (163Kj), proteína (0,6 g), gordura (0.1 g), minerais (0.5 g), fibra (0,8 g), Carboidratos (7.2 g), β -caroteno (888 μ m), carotenoides totais (2.740 μ m), sódio (3 mg), ferro (0.10 g), vitamina E (0,73 mg), niacina (3 mg) e conteúdo de água (89%).

O Brasil é o segundo produtor mundial, após a Índia de cultura do mamão, mesmo com as crises hídricas ocorridas nos anos de 2016/2017, a produção nacional deste fruto em 2017 foi de 449,909 mil toneladas. Os dados de exportação indicam que houve incremento de 3,1% no volume de mamão vendido para fora do País em 2017, com 39.117.411 toneladas com faturamento de US\$ 41.349.952 milhões (Anuário Brasileiro de Fruticultura, 2018). Ainda de acordo com o Anuário Brasileiro de Fruticultura (2018), o mamão foi um dos frutos brasileiros no ano de 2016, com maior exportação para Europa, sobretudo para o mercado Português que adquiriu US\$ 8,140 milhões e 6,982 mil toneladas do fruto comercializados. Por ser um fruto climatérico, o mamão apresenta intenso metabolismo com altas taxas de respiração (ZHU et al., 2013) e consequentemente elevada perda de massa, com rápido amadurecimento, dificultando assim, o armazenamento por períodos prolongados. A atividade respiratória é influenciada pela fisiologia do fruto e muda conforme frutas amadurecem após a

colheita, com condições de temperatura e atmosfera durante o armazenamento exercendo uma influência significativa (MARTINS et al., 2014). Desta forma, é imprescindível uma atenção especial no manuseio pós-colheita desta fruta, pois sua susceptibilidade a fatores como temperaturas, baixa umidade, doenças pós-colheita e danos mecânicos, podem comprometer sua qualidade, dificultando a comercialização (DURIGAN, 2013). Quando colhido fisiologicamente maduro, passa por profundas mudanças na fase de amadurecimento, o aumento nos níveis de etileno desencadeia uma gama de transformações nos frutos, que resultam em mudanças na coloração da casca, na firmeza, na cor e no sabor da polpa (LI et al., 2013). Na fase de amadurecimento, há um pico de emissão de etileno, geralmente em concordância com a atividade respiratória máxima do fruto (Ong et al., 2013) e este difundisse livremente através das membranas, ativando assim, o amadurecimento dos frutos (SIVAKUMAR e WALL, 2013). Esta taxa respiratória é dependente da espécie do vegetal, e ainda podem variar entre os cultivares, fornecendo moléculas orgânicas fundamentais para demais rotas metabólicas (NUNES-NESI et al, 2010). Uma das mudanças durante o amadurecimento dos frutos, a perda da firmeza dos frutos é uma das características relacionadas ao amadurecimento do mesmo, que ocorre devido a degradação da parede celular (celulose, hemicelulose, pectinas, proteínas estruturais e lignina), sobretudo da pectina. Com isso, por apresentar uma elevada perecibilidade, o mamão necessita de mecanismos que controlem o amadurecimento, para surtir numa maior vida útil pós colheita, com intuito de dinamizar o mercado interno e externo (TREVISAN *et al.*, 2013).

2.3. Recobrimentos Biodegradáveis

O uso de tecnologias que aumentem e garantam a vida útil pós colheita e a qualidade de frutos e hortaliças, utilizando materiais sintéticos, é considerado mecanismo de preservação empregado de longo tempo. Entretanto, devido os impactos ambientais, o uso de recobrimentos/filmes biodegradáveis e comestíveis surge como uma alternativa emergente, que visa reduzir o uso de substâncias sintéticas, além de reduzir o uso de material que não seja biodegradável (MARAN, et al, 2013). Esta forma de conservação é considerada mais segura, visto que o consumidor está cada vez mais preocupado com a segurança alimentar e demanda por aquisição de alimentos sem a presença de substâncias sintéticas que possam ser nocivas a saúde. A exemplo disso,

países importadores de frutas detêm normas rigorosas quanto aos limites máximos de resíduos de agrotóxicos ou substâncias retardantes da maturação nas cascas das frutas (MAVUSO; VAN NIEKERK, 2013).

Esta preocupação da população está relacionada ao consumo de alimentos seguros, que carreguem consigo o conceito de conscientização ambiental sem a presença de material polimérico, a base de petróleo (GALGANO et al., 2015). A utilização de matérias primas biodegradáveis e de fontes renováveis, tem sido uma alternativa para fugir do consumo de alimentos que contenham substâncias nocivas à saúde e ao meio ambiente. Este conceito de biodegradável se deve à presença de componentes que apresentem quebra de ligações químicas em suas cadeias, através da ação de agentes biológicos como as enzimas e microrganismos (ASTM 1995). A utilização de matérias primas oriundas de fontes renováveis tem grande aceitabilidade comercial e ambiental (SOROUDI; JAKUBOWICZ, 2013).

O uso de técnicas que aumentem e garantam a vida pós colheita e a qualidade de frutas é estudado constantemente como alternativa para reduzir o uso de substâncias sintéticas e reduzir o uso de material que não seja biodegradável (MOHAMED et al., 2013; MARAN, et al., 2013). Esta forma de preservação é considerada mais segura para frutas pós colheita, em vista, que o consumidor está cada vez mais preocupado com a segurança alimentar, demanda por aquisição de produtos orgânicos. Por exemplo, países importadores de frutas, detêm normas rigorosas quanto aos limites máximos de resíduos na casca das frutas (MAVUSO e VAN NIEKERK, 2013).

Novas tecnologias estão sendo elaboradas para utilizar matérias primas biodegradáveis, a fim de substituir plásticos não biodegradáveis. O amido é uma matéria-prima muito comum, amplamente disponível e barato (GUTIÉRREZ et al., 2015), com processo de extração que gera menos impurezas (AURAS; ARROYO; SELKE, 2009). Porém, para elaboração de filmes e ou recobrimentos, apenas o amido não fornece boas propriedades de barreira (DE MORAES et al., 2013). Estas podem ser melhoradas pela adição de componentes lipídicos como os óleos essenciais (SANTOS et al., 2014), que apresentam abordagem eficaz para melhorar as propriedades mecânicas e físicas dos filmes (KANATT et al., 2012), além de terem capacidade antifúngica numa matriz amilácea, melhorarem as propriedades físicas, bem como, produzir filmes bioativos como alternativa para substituição de conservantes sintéticos (MUÑOZ-BONILLA; FERNÁNDEZ-GARCÍA, 2012; CAETANO et al., 2018).

O uso de diversos ingredientes biodegradáveis é essencial para formação de filme e/ou recobrimentos que possam agir na manutenção da qualidade de frutas, a exemplo temos os polissacarídeos e óleos essenciais (SHOJAEE-ALIABADI et al., 2013). Dentre estes, o amido é um dos polissacarídeos mais importantes utilizados para desenvolver filmes biodegradáveis devido ao seu potencial para formar uma matriz continua, de baixa permeabilidade ao oxigênio quando comparado a filme não amiláceos, além de ser incolor e de baixo custo (JIMÉNEZ et al., 2012). No entanto, a formulação com a presença de amido, produz filmes quebradiços, com pouca resistência mecânica, com isso, se torna essencial a adição de outras matérias primas que melhorem sua flexibilidade (MALI 2004). Outra substancia também biodegradável e que pode apresentar fatores indesejáveis como solubilidade em água é o alginato de sódio, mais com a adição de outros componentes biodegradáveis, o mesmo pode formar filmes insípidos, inodoros, flexíveis, pouco permeável ao oxigênio e óleos.

Matérias primas biodegradáveis como a quitosana que é um polissacarídeo com característica catiônica, obtida a partir da quitina por desacetilação, e óleos essenciais são fontes renováveis que proporcionam melhoria nas características físicas dos filmes, por apresenta baixa permeabilidade ao O₂, biocompatibilidade a outras matérias primas biodegradáveis e atóxico (KANATT et al, 2012; BONILLA et al, 2014), com propriedades antifúngicas, inibindo a esporulação de microrganismos (TAN et al, 2015) e ação antifúngica contra óleo essencial de canela com ação antifúngica contra *Aspergillus niger* (PERDONES et al, 2014) e óleos essenciais louro e orégano contra *Fusarium verticillioides* (ROSELLÓ et al, 2015).. Esta constatação foi explicitada por Aquino et al (2015) ao estudarem efeito de recobrimento a base de amido de mandioca, quitosana em goiabas, para inibição de bactérias Gram negativas (SANTACRUZ, RIVADENEIRA e CASTRO, 2015).

O uso destas matérias primas biodegradáveis podem agir de forma sinérgica para formação de bons filmes, com propriedades físicas e antifúngicas. Saber do comportamento dos mesmos e suas características é essencial para sua elaboração e sobretudo aplicação em frutos. A forma de aplicação de recobrimentos pode ser realizada de duas formas: (I) imersão dos frutos em solução filmogênica ou por (II) aspersão (JUNIOR et al., 2010). A Legislação Brasileira não descreve uma norma para revestimentos/recobrimentos, o que pode –se considerar de acordo com Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é que estes podem se enquadrar como

ingredientes (melhora na qualidade nutricional) ou aditivos (não modifica o valor nutricional), obedecendo assim, o Decreto 55.871, de 26 de março de 1965; à Portaria nº 540 – SVS/MS, de 27 de outubro de 1997 e à Resolução CNS/MS nº 04, de 24 de novembro de 1998, referentes ao regulamento sobre aditivos e coadjuvantes de tecnologia e também às considerações do Codex Alimentarius, do Food and Drugs Administration (FDA).

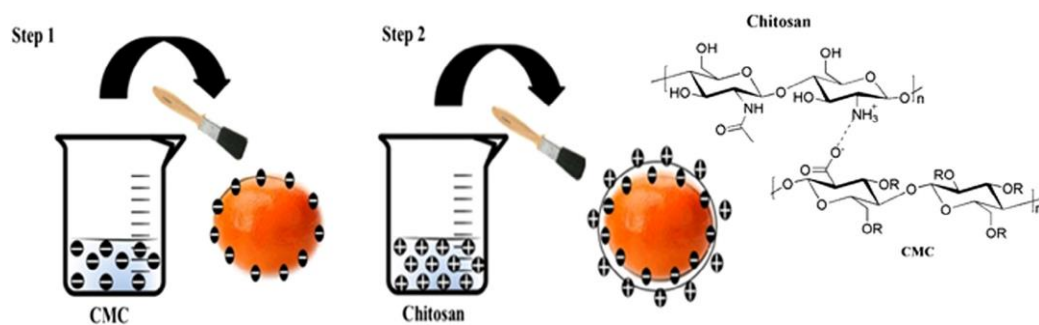
No entanto, a utilização de óleo essencial de erva doce pode provocar desorden fisiológicas nos frutos, a incluir o mamão que é um fruto extremamente sensível. A forma de disponibilizar este nos filmes sem perder seu efeito antifúngico é um desafio. Mais existe alternativa de transforma-lo em nanoemulsão, forma que é viável, mantendo suas propriedades. Uma forma de maximizar, os efeitos do óleo essencial de erva doce na forma de nanoemulsão é aplica-lo em frutos na condição de bicamada. Preferencialmente como primeira camada, sem contato direto na casca dos frutos.

2.4. *Bicamadas Biodegradáveis*

A técnica de deposição eletrostática camada-por-camada ou bicamada se originou na ciência dos materiais e tem uma ampla gama de aplicações (GOMES et al., 2011). A abordagem é baseada na deposição alternativa de polieletrólitos de cargas opostas (Figura 2), e visa uma eficiência no controle de propriedades e funcionalidades do material (POVERENOV et al., 2014), que pode ser seguida de lavagem ou secagem antes da aplicação da segunda camada (MCCLEMENTS; DECKER; PARK, 2009).

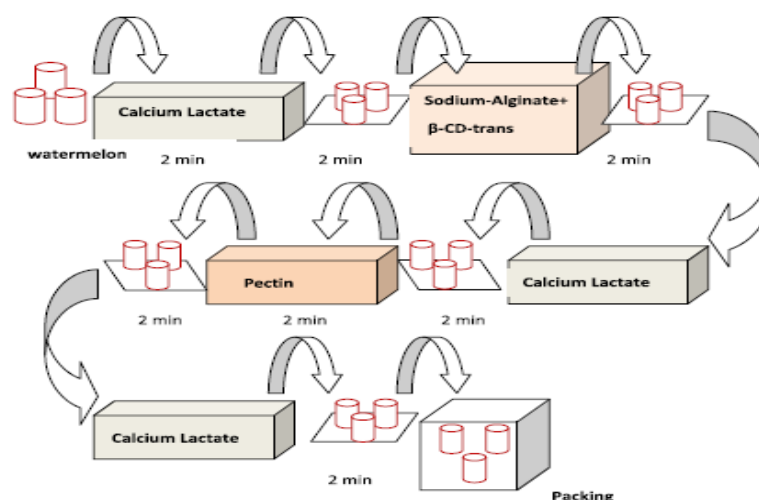
De acordo com Soliva – Fortuny (2010), esta técnica tem sido cada vez mais utilizada como alternativa para recobrimentos hidrofílicos que são aplicados em frutas minimamente processadas. Mais de uma camada é adicionada aos frutos, a fim de unir fisicamente e quimicamente, ou seja, vegetais são imergidos em soluções filmogênicas distintas que apresentam polietrólitos de cargas opostas (SKURTYYS et al., 2010). Esta técnica consiste em adsorção direta de uma camada de polieletrólito carregada de forma oposta, por exemplo, polissacarídeos, numa camada primária de emulsionantes iônicos, por exemplo, proteínas (BENJAMIN et al, 2012).

Figura 2. Aplicação de duas camadas: ácido oleico, seguido de quitosana em citrus. **Fonte:** Arnon et al, (2015).



Como se percebe na Figura 1 a aplicação de duas camadas apresenta polietólitos de cargas opostas é uma técnica relativamente simples; esta forma de aplicação pode ser feita com mais de duas camadas Figura 2.

Figura 3. Aplicação de bicamadas em melancia minimamente processada, composta por camadas de lactato de cálcio, alginato de sódio, lactato de cálcio, pectina e por fim lactato de cálcio. **Fonte:** Sipahi et al (2013).



A quantidade de camadas vai variar de acordo com o tipo de vegetal e ingredientes utilizados para formar a camada (filme). Neste trabalho, Sipahi et al., (2013) utilizaram mais de duas camadas, para manutenção da qualidade de melancia. Arnon et al., (2015), ao utilizarem ácido oleico e quitosana diagnosticaram que estes ingredientes foram eficientes na formulação de bicamadas, melhorando o brilho dos frutos. Outro estudo executado por Martiñon et al., (2014), também aplicou esta técnica, em melão minimamente processado armazenado a 4°C recoberto com bicamadas composta por trans-cinnamaldeído e quitosana, que foram capazes de inibir o crescimento de mesofilos e leveduras, respectivamente. No entanto, quanto ao sabor as concentrações utilizadas foram um empecilho na aceitação sensorial.

Esta técnica também foi aplicada em mamão minimamente processado, o qual, foi submetido a bicamadas compostas por complexo antimicrobiano trans-cinamaldeído e beta – ciclodextrina, aliados a quitosana, pectina e cloreto de cálcio. A qualidade microbiológica e físico-química do mamão fresco revestimento surou até 15 dias em temperatura de armazenamento de 4°C, enquanto frutas não revestidas não conseguiram se manter com qualidade, e aos 07 dias de armazenamento já apresentaram condições indesejáveis de consumo, tal revestimento reduziu as perdas de conteúdo de ácido ascórbico e carotenóides totais (BRASIL et al., 2012).

A aplicação das bicamadas pode ser realizada também com uso de uma ou mais camadas de fase lipídica, a aplicação de óleos essenciais na sua forma natural ou na forma emulsionada. Neste contexto, Benjamim et al (2012), elaboraram emulsões compostas de óleo de soja, pectina e leite desnatado com intuito de carregar compostos orgânicos voláteis, o qual demonstrou estabilidade e manteve tais compostos nos recobrimentos elaborados. Vale salientar que as bicamadas nos trabalhos citados acima, foram elaboradas para aplicação em frutas minimamente processadas, no entanto, o uso dessa técnica pode ser aplicado em frutos íntegros que apresentem uma superfície lisa de fácil escoamento de recobrimentos. Assim, a aplicação de camada por camada (bicamada) pode também ser uma alternativa para melhor adesão, em frutos com esta característica, a fim de manter a qualidade microbiológica e funcional. A utilização de diversas matérias primas na elaboração de bicamadas, vai depender do tipo de fruto e ação que se almeja, com isso logo em seguida esta a descrição das suas características e funcionalidade das matérias primas biodegradáveis utilizadas neste estudo.

2.5. Nanoemulsões

As nanoemulsões apresentam tamanho de gotículas abaixo de 100nm, são agentes carreadores de compostos bioativos e protetores de componentes lipídicos, formadas pela composição de óleo em água (O/A) (BHARGAVA et al., 2015). Por apresentar tal condição McClements e Rao (2011), indicam que esta forma de condicionar fase lipídica em fase aquosa melhora as propriedades físico químicas e serem mais estáveis, além de melhorar a atividade biológica do composto lipídico.

As nanoemulsões podem ser preparadas usando baixa energia ou alta energia, os métodos de baixa energia dependem da formação espontânea de pequenas gotas de óleo em certos sistemas de surfactante (óleo-água) quando sua composição ou condições ambientais são alteradas em uma maneira específica (SOLANS; SOLE, 2012). Métodos

de alta energia para produzir nanoemulsões dependem de equipamentos para gerar pequenas gotículas de óleo fino (MCCLEMENTS; RAO 2011). A escolha do agente emulsionante é primordial para o sucesso na obtenção das nanoemulsões, a exemplo e de larga utilização está o Twen, que apresenta baixo peso molecular, proteínas flexíveis (gelatina) e polissacarídeos (goma arábica, amidos).

As propriedades físicas das nanoemulsões, elaboradas com óleos essenciais apresentam maior estabilidade (SALVIA-TRUJILLO et al, 2013), e elevada atividade antibacteriana (LIANG et al., 2012; SEVERINO et al., 2015). Em relação as emulsões convencionais, as nanoemulsões elaboradas com uso de alta energia (OTONI; MOURA, et al., 2014; OTONI et al., 2014), aplicadas em filmes, apresentam maior atividade funcional e estabilidade. Nejadmansouri et al., (2016) ao estudarem efeito do ultrassom na estabilidade de nanoemulsões a base de óleo de peixe, indicaram que o tamanho da partícula é diretamente afetado pelo uso dessa alta energia e que as emulsões convencionais apresentaram maior taxa de oxidação do que as nanoemulsões.

Diversos estudos vêm confirmando o efeito do uso de nanoemulsões como agentes antimicrobianos estáveis. A aplicação das nanoemulsões elaboradas a partir de solução a base de alginato de sódio e óleos essenciais de tomilho, citrus e salvia foram eficientes quanto a sua dispersão em filmes elaborados, bem como, inibindo o crescimento de bactéria *Escherichia coli* (ACEVEDO-FANI et al., 2015); óleo essencial do tomilho nanoemulsionado apresetou efeito na deterioração microfermentativa (CHANG et al., 2015). Óleo essencial na forma de nanoemulsão de canela, limão e bergamota possuem forte atividades fungitóxicas, contra *Aspergillus niger* (RIBES et al., 2016). A incorporação de nanoemulsões de cinamaldeído em filmes de quitosana também demonstra efeito melhorador das características permeáveis do filme, e inibição de *Scherichia coli* e *Staphilococcus aures* (CHEN et al., 2016). Contudo na elaboração de nanoemulsões o uso de polissacarídeos, diversos tipos de óleos e polímeros é viável para elaboração de filmes estáveis e com ação antifúngica e antibacteriana. Mais ainda não há estudos voltados a elaboração de naonemulsões com óleo essencial de erva doce e nem sua aplicação como bicamada.

2.6. Fruta Pão (*Artocarpus altilis*) com Fonte de Amido

Oriundo da família Artocapus e conhecido popularmente como fruta pão, as espécies de Artocarpus são conhecidos por ocupar uma variedade de nichos ecológicos em diferentes habitats. O Artocarpus (Moraceae) não são uniformes em todo o mundo,

a família é composta por 60 gêneros que compõem 1400 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais. Este gênero é composto por frutos que apresentam elevado teor de amido e que normalmente apresenta tamanho redondo (as vezes cilíndricas), pesando 1-4 kg (JAGTAP; BAPAT, 2010). O Fruta-pão (*Artocarpus altilis*) é originário do Pacífico Sul e muito difundido no resto da Oceania, seu consumo é realizado na forma da polpa cozida, frita ou assada. Além disso, pode ser utilizado como matéria prima para elaboração de novos produtos: cookies, pães e farinhas (SOUZA et al., 2012; MA et al., 2012). Quando comparado com outros alimentos básicos como milho, batata doce, inhame e trigo, as propriedades nutricionais do amido de fruta-pão são adequadas para uma gama de dietas e aplicações (TURI et al., 2015). Além disso, Jagtap e Bapat (2010) afirma que a fruta pão apresenta em sua composição, propriedades farmacológicas (atividades antiviral, antibacteriana, antituberculosa).

A fruta pão também pode ser utilizada na preparação de alimentos que necessitem de fermentação (panificação), o mesmo apresentou ser um bom co-fermentador (ADENIRAN; AJIFOLOKUN, 2015). Alguns autores identificaram cultivares selecionadas de fruta-pão com conteúdo de carotenóides Jones, Baker e Ragone (2013) e Liu et al., (2014) concluíram que este fruto tem um grande potencial para aliviar a fome e aumentar a segurança alimentar nas regiões tropicais, considerando sua grande produtividade.

A fruta-pão é formada a partir da conformação de vários ovários que se fundem de 1500-2000 flores anexadas ao eixo ou núcleo do fruto. A árvore de fruta-pão é perene, produzindo frutos sazonais ao longo de um período de 4-6 meses. A fruta-do-pão é uma cultura de planícies tropicais úmidas e quente que faz melhor às temperaturas de 21-32 °C. A árvore de fruta-pão produz frutos nutritivos, com elevado teor de carboidratos e que pode ser consumido em todas as fases da maturidade. A fruta-do-pão é climatérica com rápida taxa de respiração pós-colheita; os frutos amadurecendo em apenas 1-3 dias (WORRELL et al., 2002).

Nwokocha e Williams (2011) ao compararem teor de amilose e índice de cristalinidade entre amido de fruta pão e amido de inhame, constatou que ambos apresentam similaridades, no entanto, o formato e tamanho dos grânulos de amido foram distintos entre os dois tipos de amido. O amido de fruta pão apresentou menores grânulos e de formato irregular. Já Latchoumia et al. (2014) ao estudarem a composição química da fruta pão, identificaram em sua composição teor de água (69,9%), proteína (1,02 g/100g), carboidratos (28,95g/100g) e amido (17,21 g/100g).

Os altos teores de fósforo, cálcio e magnésio na fruta-pão sugerem o mesmo como boa alternativa para suplementação mineral (SOUZA et al., 2016). Entre os amidos tradicionais, a fruta-pão tem sido um alimento básico de uma cultura tradicional, por mais de 3.000 anos e é amplamente cultivada no Caribe e outras regiões do mundo. Agora está sendo reconhecido por seu potencial por impactar positivamente a fome (JONES et al., 2013). Uma única árvore de fruta de pão produz 200-400 kg por ano (JONES et al., 2011, LIU et al., 2014). As propriedades referidas à fruta pão mencionada acima, torna uma alternativa viável para utilização do mesmo na extração de amido para posterior uso.

2.7. Óleo Essencial de Erva Doce (*Foeniculum vulgare* Mill.)

A erva-doce (*Foeniculum vulgare* Mill.) pertence a família *Apiaceae*, também é conhecida popularmente como funcho, falsa-erva-doce e anis-doce. É uma erva perene ou bienal, aromática, nativa da Europa e amplamente cultivada em todo o Brasil (LORENZI; MATOS, 2008). É uma erva resistente, perene-umbellífera, com flores de tonalidades amarelas. Ele cresce até um máximo de 2,3m com hastes ocas, suas folhas crescem até 40 cm de comprimento; O fruto é uma semente seca de 4 a 10 mm de comprimento (GROSS et al., 2009). A erva doce apresenta características como propriedades aromáticas, condimentares e medicinais com uso em medicamentos naturais e indústria cosmética. Seu óleo essencial apresentar princípios ativos com atividade biológica (PAREJO et al., 2004)

A cultura ocorre naturalmente na América do Norte (RAMALHO, et al. 2012), no Brasil, esta é considerada fonte de renda de vários agricultores, principalmente na região Nordeste, que o cultivo de erva doce vem se destacando (LIRA; BATISTA, 2006). No estado da Paraíba, o *Foeniculum vulgare* Mill. É produzido em períodos quentes (RAMALHO et al., 2012). De acordo com Garg et al (2010) de acordo com estes autores, esta cultura apresenta propriedades carminativas, aromatizantes, antioxidantes, antifúngicas e antibacterianas.

Existem duas variedades importantes de erva-doce que são *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* (funcho amargo) e *Foeniculum vulgare* var. *doce* (erva doce). O óleo essencial obtido é caracterizado pela presença de vários componentes, incluindo componentes principais, trans-anetólo, fenchona, metil-chavicol, eugenol, limoneno (HE; HUANG, 2011). A composição de óleo essencial de *F.vulgare* exibe considerável

quimodiversidade dependendo do método de extração e origem geográfica. A acumulação desses compostos voláteis dentro da planta é variável, aparecendo praticamente qualquer uma das suas partes viz. raízes, caule, brotos, flores e frutos (DIAAZ-MAROTO et al., 2006; GROSS et al., 2009).

As diversas funções do óleo essencial vão desde aliviar o acúmulo de gás intestinal, espasmos, diminuir estresse e o nervosismo, bem como, atividade antibacteriana, antifúngica, antioxidantes, anti-inflamatórias (MESFIN et al., 2014). Além de ser também benéfico na proteção de plantas como inseticidas, fungicidas e bactericidas naturais (BAKKALI et al., 2008; MATUSINSKY, et al., 2015; PAVELA et al. 2016).

Estudo apontam que a composição química e bioquímica do óleo essencial de erva doce pode variar de com as condições genéticas, cultivo, clima (TELICI; DERMITAES; SAHIN, 2009). Os óleos essenciais de *F. vulgare* foram relatados fonte de compostos antifúngicos com concentração relativa do componente anetol, que varia consideravelmente dependendo do estado fenológico e da origem do erva-doce (DIAAZ-MAROTO et al., 2006; BARAZANI et al. 2002). Telci et al., (2009) indicam que o conteúdo de trans-anetol, presente no óleo essencial de erva doce como principal componente antifúngico, com variação de 81,63% a 87,85% foi relatado com elevada atividade antimicrobiana. De acordo com Araujo, et al (2013), extratos de sementes de erva doce representam alternativa terapêutica para infecções com microorganismos resistentes aos antibióticos sintéticos disponíveis no mercado.

2.8. Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo catiónico produzido pela desacetilação de quitina, obtida a partir de carapaças de crustáceos, é uma matéria prima biodegradável, atóxico, antifúngica, este ultimo apresenta maior ação quando seu grau de desacetilação for maior (PAGLIARULO et al., 2016). Os revestimentos de quitosana demonstraram efeitos positivos sobre a qualidade da carambola (GOL; CHAUDHARI; RAO, 2015) e mamão (ALI et al., 2011), por formarem uma membrana semipermeável com atmosfera interna modificada, reduzindo a respiração e transpiração nas frutas e vegetais.

A quitosana tem múltiplas propriedades biológicas e químicas é dissolvido em uma solução de ácida, e apresenta carga positiva elevada em grupos NH^{3+} , essa característica fornece excelentes propriedades iônicas aos géis de quitosana. Além disso,

a quitosana tem propriedades antibacteriana e antifúngica e protege frutas contra fungos e consequentemente a deterioração (ATIA et al., 2005).

O modo de ação da quitosana é influenciado por diferentes fatores, os mais importantes são a origem (PARK; NAH; PARK, 2011), o peso molecular e o grau de desacetilação (KONG et al., 2010). A quitosana mais ativa, tem ação na superfície celular de fungos e/ou bactérias (COSTA et al., 2012; MANSILLA et al., 2013, WANG; NA; GAO, 2015). Considera-se que esta interação ocorre principalmente por ação eletrostática por permeabilização da membrana celular (KRAJEWSKA; WYDRO; JANCZYK, 2011; PALMA-GUERRERO et al., 2010) e ocorre entre as cargas positivas dos grupos amino protonados da quitosana e as moléculas carregadas negativamente em a superfície celular. Primeiro, a quitosana afeta a membrana celular através de interações eletrostáticas com os fosfolípidos negativamente carregados, uma vez que a membrana celular é interrompida, a quitosana é capaz de entrar na célula. Em geral, a permeabilização da superfície celular leva a vazamento de material intracelular que resulta em morte celular (COSTA et al., 2012). Há também a ação da quitosana sobre a expressão do DNA pela união de ácidos nucleicos (GALVAN MARQUEZ et al., 2013). Isso pode levar à inibição da síntese de DNA / RNA (GOY; BRITTO; ASSIS, 2009) e à interrupção da síntese de proteínas (GALVAN MARQUEZ et al., 2013). No entanto, para fungos resistentes a quitosana, ele parece que a quitosana não é capaz de permeabilizar a membrana celular e permanece na superfície externa, por diferença na fluidez da membrana celular. Isso contrasta com os fungos sensíveis a quitosana, onde a perturbação da membrana celular é observada em conjunto com vazamento de material intracelular e penetração de quitosana na membrana celular (PALMA-GUERRERO et al., 2010). Em função da biodegradabilidade e da não toxicidade a quitosana é utilizada para muitas aplicações: membranas para purificação de água (THAKUR; VOICU, 2016), aditivo para embalagens ou na preservação de alimentos (MITELUT, et al. 2015;), agente farmacêutico (CHEUNG, et al. 2015).

Neste sentido, visando o desenvolvimento de tecnologias limpas, este trabalho visa explorar a fruta pão como fonte de amido para preparo de recobrimentos e sua associação com quitosana e nanopartículas de óleo essencial de erva-doce para retardar o amadurecimento, controle do crescimento microbiano e manutenção da qualidade pós-colheita de mamão ‘Golden’.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Para o desenvolvimento dos recobrimentos biodegradáveis em bicamadas nanoparticulados, foram utilizadas amido de fruta – pão, quitosana (Polymar) e alginato de sódio grau alimentício (Dinâmica), óleo de erva doce (*Foeniculum vulgare Dulce*) (Ferquima), tensoativo (Twenn 40®) e plastificante glicerol (Dinâmica). Além destes componentes serem utilizados para elaboração das bicamadas, os mesmos também foram utilizados na elaboração das análises microbiológicas com *C. gloeosporioides* purificado, e meio de cultura Ágar Batata Dextrose.

Para determinação do efeito das bicamadas nanoparticuladas em frutos, foi adquirido no comércio de Campina Grande/PB, na Empresa Paraibana de abastecimento e Serviços Agrícolas (EMPASA), mamões Golden no estágio de maturidade grau 2 (25% de coloração amarela e 75% de coloração verde). Os mesmos foram acondicionados em caixas plásticas higienizadas e transportados cuidadosamente, ao Laboratório de Biologia e Tecnologia Pós – Colheita da Universidade Federal da Paraíba, Campus II/Areia.

Os frutos foram retirados das caixas e colocados em ambiente a temperatura de $18 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$, a fim de retirar o calor dos frutos. Logo em seguida foi submetido a sanitização com hipoclorito a 200ppm durante 15 minutos e deixados dispostos em cima de bancada previamente sanitizada para secagem. Em seguida foi feita a seleção de frutos para execução do trabalho.

3.2 Métodos

Os métodos utilizados para elaboração deste trabalho, estão divididos em três etapas, que compreendem em caracterização físico química do amido (I); caracterização microbiológica e físico química dos filmes de bicamadas nanoparticulados (II) e aplicação das melhores formulações quanto a caracterização citada acima, em frutos íntegros de mamão Golden (III).

3.3 Etapa I - Obtenção e Caracterização do Amido de Fruta Pão

3.3.1. Método de extração do amido e Composição centesimal do amido extraído da fruta pão

No Laboratório de Biologia e Fisiologia Pós Colheita, foram utilizados frutos em estágio de maturação distintos (verde e maduro) para estabelecer melhor rendimento de extração do amido. Onde foram utilizados 10 quilos de frutos verdes e maduros. Os quais foram lavados e higienizados separadamente, em solução clorada a 200ppm, logo em seguida descascados e a polpa foi cortada em pequenos pedaços para facilitar a trituração (SCHOCH e MAYWALD, 2001).

Em liquidificador industrial a polpa foi triturada com auxílio de água destilada, até a obtenção de massa homogênea e fina. Em seguida a massa foi então prensada em tecido de algodão. A suspensão de amido foi decantada por 60 min a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) sendo este lavado várias vezes com água destilada para retirada de interferentes (Figura 4). Em seguida a suspensão de amido foi seca por liofilização Modelo LD 1500 (Terrone) por 36 horas a -54°C .

Figura 4. Etapas do processo de extração do amido de fruta pão (A) descascamento do fruto, (B) polpa cortada em pedaços, (C) trituração e (D) filtragem.



A composição centesimal do amido extraído da fruta pão foi determinada de acordo com metodológica descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2004).

3.3.2. Amido Total, Amilose e Amilopectina: O teor de amido foi determinado conforme as Normas Analíticas do Instituto IAL (2008) e o resultado expresso em percentual (%). O amido foi hidrolisado em açúcares e 1 mL foi retirado para realização do teste com Lugol (Iodo em iodeto de potássio), adicionado 3 gotas de lugol e

verificou-se a coloração resultante devendo este ser amarela. A seguir a amostra foi transferida para Bequeres e a com auxílio de um pHmetro (Quimis) a solução foi neutralizada com NaOH 10% (m/v). Após neutralização o volume foi transferido para balão volumétrico de 250 mL e o volume completado com água destilada, em seguida a titulação de açúcares por Lane-Eynon com solução de Felhing A e B. Para determinação do teor de amido utilizou-se a equação:

$$\% \text{ amido} = \frac{250 \text{ mL} \times \text{TL} \times 90}{\text{Media de vol. Gasto} \times \text{PA}}$$

Media de vol. Gasto xPA

Os conteúdos de amilose e amilopectina foram determinados por curva padrão, conforme descrito por Martinez e Cuevas (1989), com adaptações. Amostra de 100 mg foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, sendo acrescida de 1 mL de álcool etílico 96% GL e 9 mL de solução de NaOH 1 M e colocada em banho-maria a 100 °C por 10 min, sendo resfriada durante 30 min e o volume completado com água destilada. Da amostra, foi retirada uma alíquota de 5 mL e transferida para balão volumétrico de 100 mL, em que foi adicionado 1 mL de ácido acético 1 M e 2 mL de solução de iodo 2% (p/v) preparada três horas antes da análise, sendo, então, completado o volume de cada balão volumétrico com água destilada. Para a construção da curva padrão, foi utilizado 40 mg de amilose pura (Sigma) submetida ao mesmo procedimento utilizado nas amostras de amido de fruta pão. Foram retiradas alíquotas de 1, 2, 3, 4, e 5 mL do balão volumétrico e foram acrescidos de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 mL de ácido acético e de 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2 mL de iodo, respectivamente, completando-se o volume a 100 mL com água destilada. A leitura de absorbância foi realizada 30 min após adição da solução de iodo a 610 nm. Para cálculo foi construída curva de calibração a partir, das concentrações utilizadas do padrão.

3.3.3. Poder de inchamento e índice de solubilidade do Amido de Fruta Pão (*Artocarpus altilis*): Poder de inchamento e índice de solubilidade foram determinados pela metodologia Leach, Mccowen e schoch (1959). Foi pesado 8g de amido e solubilizados em 100ml de água destilada, os tubos foram mantidos em banho de água controlada a temperaturas de 60°C, 70°C, 80°C e 90°C por 30 minutos e agitados a cada 5 minutos em agitador de soluções. Em seguida os tubos foram centrifugados a 3500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi medido utilizando uma proveta; 1,5ml de solução foi retirada para determinação do resíduo. O poder de inchamento e índice de solubilidade foi calculado através das equações:

$$\text{Poder de inchamento (g/g)} = \frac{C}{\text{...}}$$

Ma

$$\text{Índice de solubilidade (\%)} = \frac{10 \times V \times R}{Ma}$$

Ma

3.3.4. Morfologia dos Grânulos do amido de fruta pão: A forma dos grânulos de amido foi analisada por microscópio eletrônico (Zeiss Axioskop), onde a solução de amido (1%) foi disposta em laminas e fotos foram retiradas com auxílio de programa computacional de captura de imagens.

3.4. Etapa II: Caracterização Microbiológica e Físico Química dos Recobrimentos Bicamadas Nanoparticulados.

3.4.1. Planejamento Experimental

Para elaboração dos recobrimentos bicamadas nanoparticulados, foi empregada a técnica de planejamento fatorial DCCR (Delineamento Compostos Central Rotacional) de 2^2 , com 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios. Além disso, avaliar a influência das variáveis independentes: percentual (%) de óleo essencial de erva doce (OEED) e percentual (%) quitosana (Q), nas variáveis dependentes: características físico-químicas e microbiológicas destes recobrimentos. Foram elaboradas duas camadas, onde a primeira, consite concentrações distintas de soluções de quitosana e concentração fixa de 2% amido de fruta pão (AFP) e 0,25% glicerol (GLI). E a segunda camada diferentes concentrações de óleo essencial de erva doce (OEED) nanoparticulado e concentrações fixas de 0,5%alginato de sódio (AS), 0,5% Twen 40® (TW) e 0,25% glicerol (GLI) (Tabelas 1 e 2)

Tabela 1. Concentrações utilizadas para construção da matriz do planejamento experimental

Variáveis independentes	$-\alpha (-1,41)$	-1	0	1	$\alpha (1,41)$
Óleo Essencial (OE)	0	0,07%	0,25%	0,43%	0,5%
Quitosana	0	0,15%	0,5%	0,85 %	1%

Foram utilizadas concentrações descritas na Tabela 3, para enriquecimento dos meios de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA), bem como formulação das bicamadas nanoparticuladas.

Tabela 2. Matriz de planejamento 2² níveis codificados e decodificados das variáveis, para obtenção de recobrimentos

Ensaio	OEED %	Q%	OEED %	Q %	AFP %	AS%	TW%	GLI%
1	-1	-1	0,07	0,15	2	0,5	0,5	0,5
2	1	-1	0,43	0,15	2	0,5	0,5	0,5
3	-1	1	0,07	0,85	2	0,5	0,5	0,5
4	1	1	0,43	0,85	2	0,5	0,5	0,5
5	-1,41	0	0	0,5	2	0,5	0,5	0,5
6	1,41	0	0,5	0,5	2	0,5	0,5	0,5
7	0	-1,41	0,25	0	2	0,5	0,5	0,5
8	0	1,41	0,25	1	2	0,5	0,5	0,5
9	0	0	0,25	0,5	2	0,5	0,5	0,5
10	0	0	0,25	0,5	2	0,5	0,5	0,5
11	0	0	0,25	0,5	2	0,5	0,5	0,5

Componentes fixos: OEED= óleo essencial de erva doce; Q= quitosana; AFP= amido de fruta pão; AS= alginato de sódio; TW= Twen 40® e GLI = glicerol.

3.4.2. Preparo do Inoculo do *C. gloeosporioides*

Discos com 4,0 mm de diâmetro com esporos de *C. gloeosporioides*, que foram isolados a partir de frutos, que foram reinoculados até total purificação do inóculos. Para determinação do efeito das concentrações dos componentes biodegradáveis sobre o desenvolvimento do *C. gloeosporioides*, para tal crescimento foi utilizado meio de cultura Ágar Batata Dextrose e incubados 25±2,0°C sob fotoperíodo de 12 h, durante 7 dias, no Laboratório de Biologia e Tecnologia Pós-Colheita, Universidade Federal da Paraíba.

3.4.3. Percentual de Inibição do *C. gloeosporioides*, Índice de velocidade do Crescimento Micelial e Contagem de esporos – Câmara de Neubauer:

A adição das concentrações dos antifúngicos foi feita de acordo com formulações previstas no planejamento experimental (Tabela 3). A inibição do crescimento do *C. gloeosporioides*, foi determinada seguindo a metodologia de Guerreiro et al, (2015). Onde o inoculo foi colocado em placas de petri de 90mm de

diâmetro com 6 repetições para cada Recobrimento, somado com o controle, totalizando 72 placas. Diariamente o diâmetro das colônias foi medido com auxílio de parquímetro. A inibição foi calculada através da equação:

$$\text{Inibição do crescimento micelial (\%)} = [(C-T / C) \times 100]$$

O índice de crescimento micelial dos inóculos foi calculado de acordo com metodologia descrita por Oliveira (1991), com cálculo:

$$\text{IVCM} = (D - D_a) / N$$

Sendo: IVCM=índice de velocidade de crescimento micelial; D=diâmetro médio atual da colônia; D_a =diâmetro médio da colônia do dia anterior; N=número de dias após a inoculação na placa de Petri.

As placas que apresentaram crescimento foram homogeneizadas com 10ml água esterilizada, logo em seguida foi retirado 0,5ml desta solução na câmara de contagem, onde esperou-se 2 minutos para sedimentação, número de células contadas será igual à média multiplicada pelo fator de diluição. Para obtenção do número de esporos foi aplicado cálculo. Assim temos:

$$\text{N}^\circ \text{ de células/ml} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de células}}{\text{N}^\circ \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

3.4.4. Captura de Imagem do Fungo *C. gloeosporioides*: As imagens da capturada foram coletadas, através microscópio eletrônico (Zeiss Axioskop), com lente de 40x, dos fungos frente a inibição das substancias antifúngicas foram determinadas no laboratório de Botânica da Universidade Federal da Paraíba.

3.4.5. Determinação do índice de proteção das bicamadas ao Mamão Golden: Frutos de mamão Golden foram submetidos a determinação de proteção contra o ataque do *C. gleosporioides*. Os mesmos foram recobertos com as bicamadas nanoparticulados, oriundos do planejamento experimental (Tabela 3), e após secagem foi efetuado injuria em sua casca, com o auxilio de um conjunto de 6 agulhas previamente esterilizadas, e logo, inoculados 4mm de fungo. Para provocar estresse aos frutos, os mesmos foram subtidos a câmara úmida por 24 horas, para melhor condição de

desenvolvimento do *C. gleosporioides*. Foram efetuadas medições diárias durante seis dias de incubação a temperatura ambiente de $23 \pm 2,0^\circ\text{C}$.

3.4.6. Elaboração das multicamadas

Foram utilizadas alíquotas de 30mL da primeira camada, que foram disponibilizadas em placas de petri previamente higienizadas e após pré secagem a temperatura ambiente ($18 \pm 2,0^\circ\text{C}$), e com duração de 8 horas após adição, foi adicionado 20mL da segunda camada. Antes da aplicação das análises físicas todos os filmes foram submetidos a acondicionamento para estabilidade das suas características físico químicas, em câmara com temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ e 55% de umidade por três dias. Abaixo encontra-se o fluxograma (Figura 5) de elaboração das bicamadas, bem como, sua descrição.

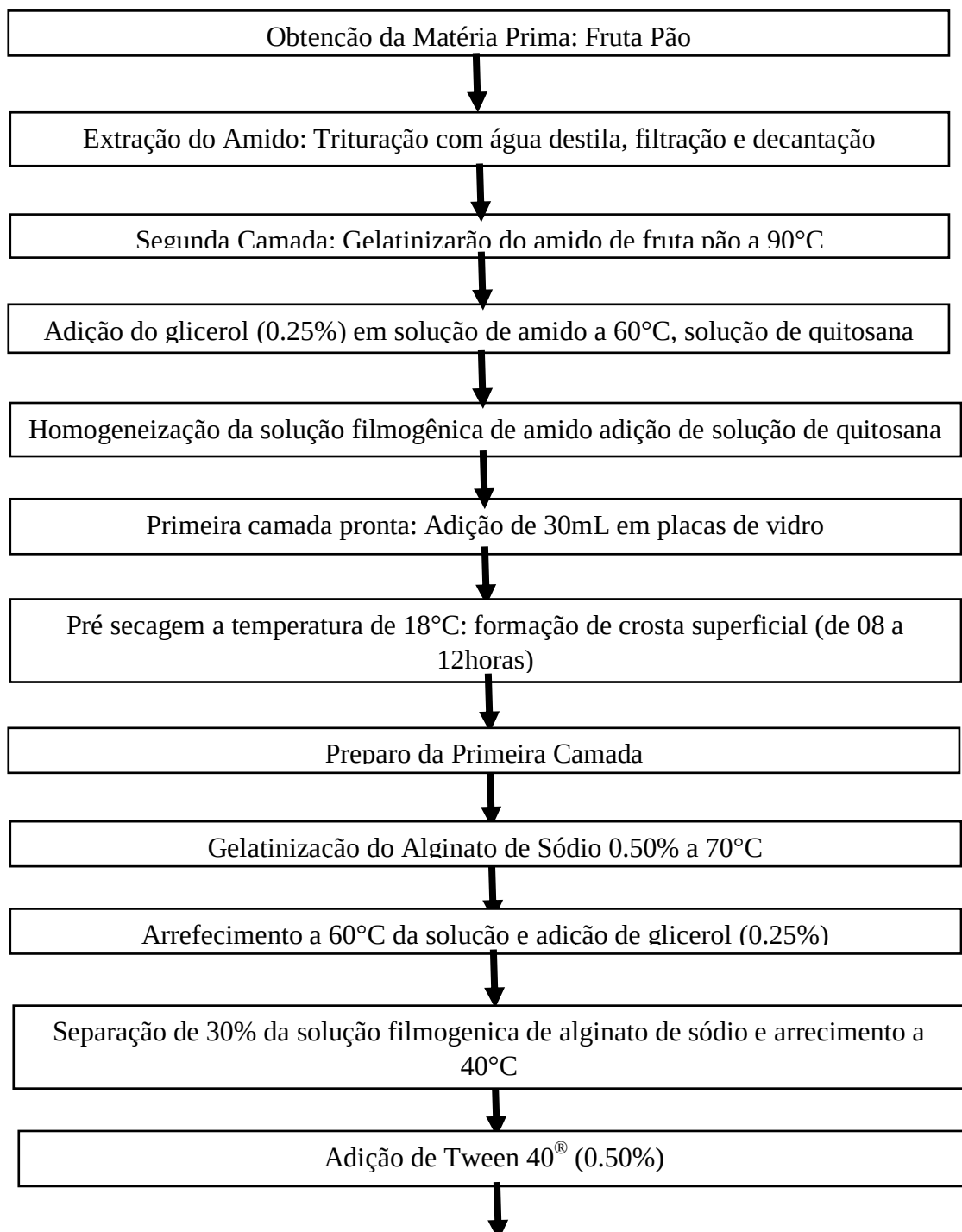
Para o preparo da primeira camada foi utilizado amido obtido de fruta pão (Figura 1) o qual foi pré processado no ultra turax a 15000 rpm por 3 minutos consecutivos e levado ao aquecimento até gelatinização a 70°C com água destilada e adicionado 0,5% de glicerol como plastificante. Os frutos foram emergidos nesta solução e deixados por 60 segundos, em seguida, foram colocados para secagem em temperatura ambiente, até completa secagem da primeira camada. A solução de quitosana foi elaborada por diluição em ácido acético a 1% de acordo com as proporções definidas no planejamento experimental.

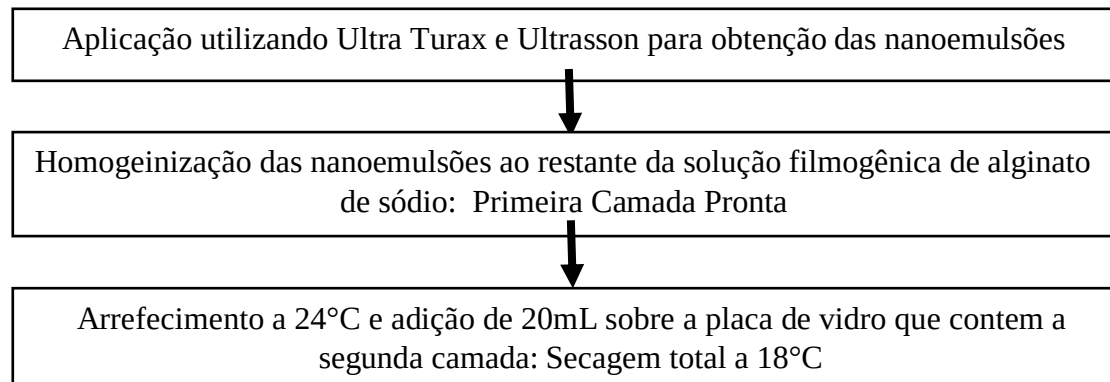
A segunda camada foi elaborada com solução composta de água destilada mais alginato (0,5%), gelatinizado a 70°C e adicionado 0,5% de glicerol para plastificação da solução. Esta solução foi arrefecida até temperatura de 40°C , parte foi utilizada (30% de solução) para adição do óleo essencial e twenn foi realizado a saber: empregado força de cisalhamento com auxílio de ultra turax a 15000 rpm por 3 minutos consecutivos, na solução a qual foi adicionada o óleo gota a gota durante este processo. Com total incorporação do óleo o mesmo foi levado para ultrassom (Hielscher ModeloUP200 st) a 90% de amplitude por 5 minutos consecutivos, a fim, de diminuir o tamanho das partículas.

Na Figura 6, estão as etapas de elaboração das emulsões deste estudo. Percebe-se que quanto menor a concentração de óleo essencial de erva doce menor é a turbidez da emulsão. O uso de alta energia da força de cisalhamento (atrito) utilizado no equipamento de ultra turax, aliado ao ultrassom por forças de ondas através de cavitação

(criação de bolhas que se rompem em menores tamanhos). Inúmeros trabalhos fazem uso do uso de altas energias para elaboração de nanoemulsões, aliados ao uso de surfactantes.

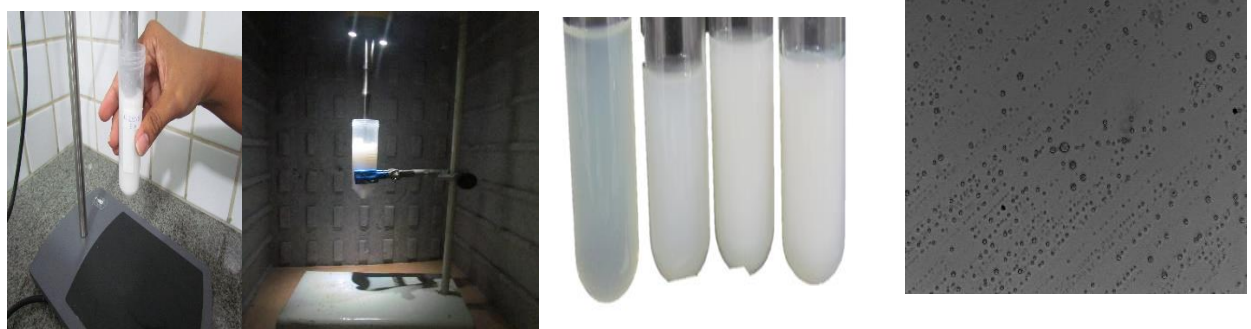
Figura 5. Fluxograma de elaboração das bicamadas com matérias primas biodegradáveis





al, (2016) com modificações, e Sanchez-Orteg et al, (2016) com modificações. Para montagem das camadas em placas de vidro para sua caracterização, foi adicionado volume de 30 ml da primeira camada e deixada em temperatura de $18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, assim que a primeira camada secou parcialmente, formando uma camada firme foi adicionado 20ml de emulsão, a qual permaneceu até completa secagem na temperatura citada anteriormente. Logo após completa secagem os recobrimentos foram retirados das placas e levados para condicionamento em câmara adaptada com temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ a 55% de umidade.

Figura 6. Elaboração das nanoemulsões a partir de alginato de sódio, Tween 40 e concentrações de óleo essencial de erva doce, aplicação de Ultra Turax a 15000 rpm por 3 minutos (A), Ultrassom a 90% de amplitude por 5 minutos; da esquerda para direita nanoemulsões prontas 0,07%; 0,25%; 0,43% e 0,5% de óleo essencial de erva doce (OEED); Micrografias em microscópio eletrônico 1000x da nanoemulsão a 0,5% OEED



3.4.7. Avaliação das propriedades funcionais das multicamadas

Determinação Instrumental da Cor: Foi realizada em colorímetro (konica Minolta), o sistema de leitura utilizado foi o da CIELAB, representado pelas seguintes coordenadas: coordenada L^* (luminosidade), coordenada de cromaticidade a^* (-a verde, +a vermelho) e a coordenada de cromaticidade b^* (-b azul, +b amarelo). Foram feitas

três amostras de filmes para cada formulação e cada um foi analisado cinco vezes alternando as posições do biopolímero. Para determinação da diferença total de cor foram analisadas as médias obtidas dos padrões L^* , a^* , b^* .

Espessura: A espessura foi medida em micrometro de precisão. Em cada amostra de filme utilizado para caracterização foram realizadas três medidas, compreendendo as extremidades, pontos medianos e centrais e a espessura final de cada amostra foi considerada como a média das três repetições.

Solubilidade: A solubilidade em água foi determinada segundo metodologia proposta por Gontard et al. (1992), com modificações. Inicialmente, a massa seca de amostras de filme de 2 cm de diâmetro foi determinada em função de sua umidade em uma estufa de secagem e esterilização, mantida a 105°C por 24 h, em seguida a amostra foi pesada (m_i) e a amostra foi imersa em 50 mL de água destilada em erlenmeyer sob agitação a 175 rpm, a 25°C, durante 24 h, utilizando-se uma mesa agitadora (QUIMIS). Após este período as amostras foram retiradas da água e a massa seca (m_f) foi determinada nas mesmas condições descritas para obtenção da massa seca inicial. A solubilidade em água foi expressa em porcentagem de material solubilizado, calculada a partir dos resultados em duplicata. Equação:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{\text{massa inicial} - \text{massa final}}{\text{Massa inicial}} \times 100$$

Permeabilidade ao vapor de água: A Permeabilidade ao vapor de água foi determinada gravimetricamente segundo teste da ASTM (1995), modificado por Gontard et al. (1992). Os filmes, em forma de disco com 4,5 cm de diâmetro, foram colocados em célula contendo sílica gel (UR = 0%; 0 Pa pressão de vapor), formando uma membrana de modo a garantir que a difusão de umidade ocorresse exclusivamente através dos filmes. A célula foi colocada dentro de um dessecador contendo água destilada (UR = 100%; 0,4297 x 10⁴ Pa pressão de vapor), em sala climatizada a 22°C, com umidade relativa e pressão de vapor constante. A célula foi pesada em balança analítica, com precisão de 0,0001 g, a cada 24 h, durante 7 dias consecutivos. A permeabilidade foi calculada por meio da Equação.

$$PVA = \frac{G \times V}{A \times T (P_1 - P_2)}$$

Em que: PVA e a permeabilidade ao vapor de água ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$); G e o ganho de massa (g) da célula durante 24 h; V e a espessura (m) média do filme; A e a área (m^2) de permeação do filme; T e o tempo (s) e P1-P2 e o gradiente de pressão (Pa) de vapor entre as superfícies do filme ($0,4297 \times 10^4 \text{ Pa}$). As análises de permeabilidade ao vapor de água foram realizadas em duplicata.

Opacidade: A opacidade aparente dos filmes foi determinada segundo uma metodologia proposta por Gontard, Guilbert e Cuq (1992) em espectrofotômetro. Amostras foram cortadas em retângulos de 1 cm x 4 cm e posicionadas a parte interna da cubeta, perpendicularmente à direção do feixe de luz, e foi realizada uma varredura na região visível de 400 a 800 nm. As medidas foram realizadas em triplicata. A opacidade foi definida como a área sob a curva, determinada por integração, por meio do método trapezoidal e expressa como unidade de absorbância x nanômetros.

Para determinação das análises de difração de raio X, infravermelho com transformada de Fourier e microscopia eletrônica de varredura, foi escolhido amostras (cerca de 10cm) de quatro filmes que apresentaram melhores resultados quanto a suas características físico químicas e microbiológicas. As determinações foram realizadas no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO, da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, e seguiu as de acordo com a descrição abaixo:

Difração de Raio X: A difração de raio x foi realizada em amostras de filmes bicamadas nanoparticulados a temperatura ambiente em aparelho XRD-7000 Shimadzu, utilizando radiação $K\alpha$ do cobre ($1,5418 \text{ \AA}$), com tensão de 40kv e corrente 30mA, sob ângulo 2θ variando de 5,0 e 70,0 graus a uma velocidade de $2^\circ/\text{min}$.

Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) A técnica FTIR foi usada para identificar as bandas características dos grupos funcionais, presentes nos materiais desenvolvidos nesta pesquisa utilizando a faixa de varredura de 4000 a 650 cm^{-1}

Espectrometria de Absorção na região Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR): A técnica FTIR foi utilizada para determinar os grupos funcionais utilizando um equipamento Spectrum 400 da Perkin Elmer.

Microscopia Eletrônica de varredura (MEV): A análise microestrutural da morfologia da superfície e secção transversal foi realizada em microscópio

eletrônico de varredura de bancasa Phenon Pro – X, aumento de 1500x, profundidade do foco 1mm, resolução de 15 KV e pressão 270Pa)

3.5. Etapa III: Avaliação dos Parâmetros da Qualidade do Mamão “Golden” Recobertos com as bicamadas

Para avaliar os parâmetros de qualidade nos frutos, foram utilizadas as melhores formulações de recobrimentos bicamadas nanoparticulados, obtidas através do planejamento experimental (Tabela 3). Foi montado experimento formado por delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial de 5x7x3, que consiste em cinco tratamentos incluindo a testemunha (sem aplicação de bicamadas nanopartilados), avaliados em sete períodos (0, 2, 4, 6, 8, 10 2 12 dias) com três repetições para cada tratamento, sendo que cada repetição consistia em a presença de quatro frutos. Para determinação da perda de massa (%), taxa de respiração e avaliação sensorial, de forma separada foram utilizados para cada tratamento três repetições, compostas por um fruto por repetição. As determinações aplicadas nos frutos foram as seguintes:

3.5.1. Avaliações Físicas

Perda de Massa fresca (%): Através de pesagens diárias de cada Recobrimento em triplicata, para cada período de armazenamento, em balança semi analítica, considerando o peso inicial da massa fresca, o percentual foi obitdo por diferença.

Firmeza (N): Determinado com uso de penetrômetro (Magness Taaylor pressure, Tester), realizada 2 leituras em cada fruto.

Sólidos Solúveis (SS - %): Determinado com leitura direta em reratomentro Abee com controle de temperatura a 20°C, de acordo com metodologia descrita por Association of Official Analytical Chemistry – AOAC (1984).

Ácidos Titulavel (AT-g de ácido cítrico. 100g⁻¹): Realizada por titulometria, com uso de solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1M e indicador fenolftaleína. Para 10g de amostra em 50mL de água destilada, conforme método do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005).

Relação SS/AT: Obtida através da divisão dos valores referentes aos sólidos solúveis (SS) e acidez total titulavel (AT).

Parametro de Cor: Foi submetido ao sistema CIELAB frutos íntegros (cascas) e desintegrados (polpa) para determinar os valores L^* , A^* e B^*

Taxa respiratória dos frutos recobertos: Ainda os Recobrimentos foram submetidos a medição da taxa de respiração dos frutos, durante todo período de armazenamento (NAKAMURA et al., 2003).

3.5.2. Qualidade Funcional

Ácido Ascórbico (mg.100g^{-1}): Realizado por titulometria, utilizando DFI (2,6-dicloro-fenol- indofenol 0,002%) em 50mL de ácido oxálico 0,5% (STROHECKER; HENNING, 1967).

Licopeno e β - caroteno (mg.100^{-1}): Utilizou 1g de polpa de amostra que foi submetida a maceração por 2 minutos, com 5mL de solvente extrator, elaborado com 2:3 de acetona + hexano. Após a maceração, o volume do extrato foi completado para 10 mL e armazenado em tubos Falcon de 15 mL, agitados por 1 minutos e centrifugados a 25°C por 9.000 rpm, para posterior leitura em espectrofotômetro, os resultados foram expressos em mg. 100^{-1} (NAGATA; YAMASHITA, 1992).

Flavonoides Amarelos (mg.100g^{-1}): Quantificados, com adaptações, conforme Francis (1982), em que se utilizou 7 mL de solução extratora de etanol 95% + HCl 1,5 mol.L⁻¹ (85:15) em 7 g de amostra foram pesados em tubo Falcon de 15 mL. Homogeneizou-se a mistura entre amostra e solução extratora por 2 minutos em agitador de tubos e manteve-se reservada, por 12 horas, ao abrigo da luz e sob refrigeração para extração. Após esse período, os extratos foram filtrados e a absorbância a 374 nm pode ser determinada. Todos os procedimentos desta determinação ocorreram no escuro.

Obtenção dos extratos a partir da polpa dos frutos de mamão: Pesou 3g de amostras em tubos Falcon de 15mL, adicionou-se 4 mL de solução metanólica a 50%, e estes foram agitados por 1 minuto e mantidos em repouso, no escuro, durante 1 hora. O extrato foi centrifugado a 4 ° C em 15.000 rpm, durante 15 minutos; e seu sobrenadante foi reservado em refrigeração 4°C e o resíduo proveniente desta primeira extração, foi ressuspenso em 4 mL de acetona 70%, deixando-se em repouso por 1 hora; este foi submetido a mesma centrifugação citada acima, obtendo assim o segundo extrato. Os

dois extratos foram combinados e o volume final ajustado para 10 mL com água destilada. Os extratos foram mantidos a -20°C até serem analisados. Todo o procedimento foi realizado no escuro.

Polifenóis Extraíveis Totais – PET ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$): Os polifenóis extraíveis foram determinados por espectrofotometria pelo método de Folin-Ciocalteu, com modificações (DANTAS et al., 2015). Foi tomada uma alíquota do extrato de 350 μL , a qual foi adicionado 150 μL de água destilada. Nesta diluição, foi adicionado 1,0 mL de reagente de Folin-Ciocalteu, 2,0 mL de carbonato de sódio 20% e 2,0 mL de água destilada, em tubos de ensaio. Logo em seguida, foram agitados, manteve-se em repouso, ao abrigo da luz, por 30 minutos e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 700 nm. O teor estimado de compostos fenólicos foi obtido utilizando-se uma curva padrão de ácido gálico ($R = 0,9986$) e os resultados expressos em mg de ácido gálico por 100g de peso fresco.

Atividade Antioxidante Total – AAT (g de polpa. g DPPH-1): Determinada mediante sequestro do radical livre DPPH (1,1'-diphenil-2-picrilhidrazil) (BRAND-WILIAMS et al., 1995). A partir do extrato fenólico, foram preparadas as diluições de 400, 600 e 800 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, das quais utilizou-se uma alíquota de 100 μL para 3,9 mL do radical 35 DPPH (0,06 mM). Como controle utilizou-se 100 μL da solução controle (álcool metílico 50% + acetona 70%) ao invés do extrato fenólico. Álcool metílico PA foi utilizado para a calibração do espectrofotômetro, no comprimento de onda de 515 nm. Todas as etapas desta determinação foram realizadas no escuro. O cálculo da AAT (g de fruta/ g DPPH) levou em conta a equação da reta ($R = 0,9938$), a partir da absorbância das três diluições, substituindo-se em seguida na equação a absorbância equivalente a 50% da concentração do DPPH (absorbância inicial do controle/2), encontrando-se a quantidade da amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (EC_{50}).

Atividade Antioxidante Total – AAT (μM de Trolox. g de polpa-1): A preparação do radical consistiu de mistura de 5 mL da solução de ABTS $\cdot$ + a concentração de 7 mM, com 88 μL da solução de persulfato de potássio a 140 mM, deixando em repouso à temperatura ambiente durante 16 horas na ausência de luz. Antes do ensaio, o radical foi diluído com etanol até a absorbância de $0,700 \pm 0,05$, medido a 734 nm. A partir dos extratos fenólicos, foram preparadas três diluições de 10,

20 e 30 mg.mL⁻¹. A uma alíquota de 3,0 ml do radical ABTS• + (absorbância de 0,700) foram adicionados 30 µL de cada diluição e, após 6 minutos, a absorbância foi lida a 734 nm. O Trolox foi utilizado como padrão, com uma curva padrão de 100 a 2000 µM (R = 0,9977). Os resultados foram expressos em µM de Trolox. g de peso fresco (DANTAS et al., 2015).

3.5.3. Análise de enzimas

Para determinação das enzimas, foi necessário, produzir extratos com 2g de amostras de polpas macerados com 5 mL de solução tampão fosfato 75mM pH 7,0

Ascobarto Peroxidase (APX): Para determinação de Ascobarto Peroxidase (APX), foi utilizado mistura contendo 1000 µL de tampão fosfato 75mM, p H 7,0, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 40µL, diluição de extrato 0,33 µL + 67 µL de tampão extrator, 360 µL desolução de ácido ascórbico a 0,3mM (NAKANO; ASSADA, 1981). Absorbancia lida em espectrofotmetro a 290nm, os resultados foram expressos em unidade de enzima por grama de amostra fresca (U/g MF).

Catalase (CAT): Na determinação da catalase (CAT), foi necessário o uso de 100 µL de extrato, 1000 µL de tampão fosfato de potássio 100mM, pH 7,8 e 400 µL de peróxido de hidrogênio 50 mM. Absorbancia lida em espectrofotmetro a 240nm. Os resultados foram expressos em unidade de enzima por grama de amostra fresca (U/g MF) (BLUME; MCCLURE, 1980)

Superoxido Dismutase (SOD): Para determinação da superóxido dismutase (SOD) foi utilizado tampão fosfato de sódio pH 7,8, solução de trabalho riboflavina 10mM e solução de NBT 750mM e extrato, nos seguintes volumes 1000 µL; 300 µL; 150 µL e 50 µL, respectivamente e lidos a um comprimento de onda de 560nm. Os resultados foram expressos em unidade de enzima por grama de amostra fresca (U/g MF).

Peróxido de hidrogênio: As concentrações de H₂O₂ foram determinadas de acordo com Velikova et al. (2000). Três g da polpa congelada foram homogeneizado em um banho de gelo com 5 mL de solução de ácido tricloroacético 0,1% (W / V). O homogeneizado e centrifugado a 14 000 rpm por 20 min a 4 ° C e foi adicionado 3,0 mL tampão de fosfato de potássio 5 mM (pH 7,0) e 1 mL de iodeto de potássio 1 M. no sobrenadante. A absorbância do foi medido a 390 nm usando um espectrofotômetro e a concentração de peróxido de hidrogênio foi expressa como mmol g⁻¹ MF.

3.5.4. Análise sensorial

Recrutamento: Os julgadores (24 pessoas) já treinados, com idade média de 28 anos, compostos por homens e mulheres consumidores de mamão, foram recrutados de acordo com a disponibilidade e experiência prévia em testes sensoriais descritivos. A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFPB, sob o nº CAAE: 45784315.9.0000.5188.

Análise Descritiva por Ordenação e uso de escala: As análises foram realizadas em cabines individuais, com auxílio de luz branca, onde 3 amostras de cada Recobrimento foram dispostas previamente para os julgadores avaliarem quanto ao sua escala avaliados através de testes de aceitação com escala hedônica, por intermédio de ficha sensorial seccionada em três partes :I – Avaliação da intensidade dos aspectos odor e sabor característicos, textura, odor e sabor estranhos, sabor amargo, ácido e doce, por escala de 9 pontos, com 1 = ausente/ extremamente fraco e 9 = extremamente forte; II – Avaliação afetiva do grau entre gostar e desgostar do aspecto de aceitação global e avaliação global, com escala de 9 pontos, sendo 1 = desgostei extremamente e 9 = gostei extremamente; III – Avaliação da intenção de compra através de escala de 5 pontos, com 1 = certamente não compraria e 5 = certamente compraria.

3.6. Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F ($p \leq 0,05$). Para a fonte de variação período de armazenamento (dias), aplicou-se análise de regressão polinomial até segundo grau; para a fonte recobrimentos (recobrimentos) foi aplicado teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para avaliações de qualidade e sensoriais e teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para avaliações de bioativos. Realizou-se análise de componentes principais (ACP) para identificar as variáveis com maior contribuição na variabilidade dos dados, bem como análise de cluster para agrupar os recobrimentos nos dias que apresentam similaridade em relação às características estudadas. Para a escolha das variáveis significativas dentro de cada componente principal, o maior autovetor foi multiplicado por 0,7. O resultado dessa operação foi considerado como limite de inclusão das variáveis, em que autovetores abaixo do mesmo não contribuem significativamente para a variância do componente principal. Utilizou-se o software

MVSP version 3.13n (KOVACH, 2006) para as análises de componentes principais e o SAS 9.3 (2011) para cluster.

4. REFERÊNCIAS

ACEVEDO-FANI, A. et al. Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p.168-177, 2015.

ADENIRAN, H.; AJIFOLOKUN, O. M. Microbiological studies and sensory evaluation of breadfruit and cassava co-fermented into gari analogue. **Nigerian Food Journal**, v. 33, p. 39–47, 2015.

ALI, A. et al. Effect of ozone pre-conditioning on quality and antioxidant capacity of papaya fruit during ambient storage. **Food Chemistry**, v.142, p. 19–26, 2014.

ALI, A. et al. Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. **Food Chemistry**, v. 124, p.620–626, 2011.

ALLOUI, H. et al. Alginate coatings containing grapefruit essential oil or grapefruit seed extract for grapes preservation. *International Journal of Food Science and Technology*, v.49, p.952–959, 2014.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM. Standard test method for water vapor transmission rate through plastic film and sheeting using a modulated infrared sensor - **ASTM F1249** - 01. Philadelphia: ASTM, 2001. 5p

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Method D 883: Standard test methods for tensile properties of thin plastic and sheeting. In: **Annual Book of ASTM Standards**. Conshohoken, Pa, 1995.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA 2015. Editora Gazeta Santa Cruz, Santa Cruz do Sul, 49p, 2018.

ANTUNES, M. et al. Edible coatings enriched with essential oils and their compounds for fresh and fresh-cut fruit. *Recent Pat. Food. Nutr. Agric*, v.4, p.114–122, 2012.

AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 17th ed. Washington: AOAC, 2005. 1115p.

AQUINO, A. L.; BLANK, A. F.; SANTANA, L. C. L. A. Impact of edible chitosan–cassava starch coatings enriched with *Lippia gracilis* Schauer genotype mixtures on the shelf life of guavas (*Psidium guajava* L.) during storage at room temperature. **Food Chemistry**, v.171, p.108–116, 2015.

ARAVIND, G. et al. Traditional and medicinal uses of *Carica papaya*. **Journal Medicinal Plants Stud**, v.1, p.7-15, 2013.

ARAUJO R, O. et al. Avaliação biológica de *Foeniculum vulgare* (Mill.) (Umbelliferae/Apiaceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.15, p.257-263, 2013.

ARAUJO L.; STADNIK M. J. Infectious process and activity of enzymes in apple seedlings of genotype resistant or susceptible to *Glomerella* leaf spot caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Trop Plant Pathol**, v. 36, p. 241- 248, 2011.

ARNON, H. et al. Development of polysaccharides-based edible coatings for citrus fruits: A layer-by-layer approach. **Food Chemistry**, v. 166, p.465–472, 2015.

AURAS, R., ARROYO, B., SELKE, S. Production and properties of spin-coated cassava-starch-glycerol-beeswax films. **Starch-Starke**, v. 61. N.8, p. 463–471, 2009.

AZERÊDO, L. P. M. et al. Qualidade de manga ‘tommy atkins’ da produção integrada recoberta com fécula de mandioca associada a óleos essenciais e quitosana. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.38, n. 1, p.141-150, 2016

BAUTISTA-BANÑOS, S. et al. A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, p. 08-20, 2013.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food Chemistry Toxic**, v.46, p.446–475, 2008.

BARAZANI O. et al. Chemotypic differentiation in indigenous population of *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* in Israel. **Biochem Syst Ecol**, v. 30, p.721–31, 2002.

BASSAN, M. M. et al. Beneficiamento pós-colheita de lima ácida ‘Tahiti’ afeta sua qualidade e conservação. **Ciência Rural**, v. 46, p. 184-190, 2016.

BHARGAVA, K, et al. Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. **Food Microbiology**, v.47, p. 69-73, 2015.

BENJAMIN, O. et al. W. Multilayer emulsions as deliveries systems for controlled release of volatile compounds using pH and salt triggers. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 109-118, 2012.

BLUME, D.E., MCCLURE, J. Developmental effects of Sandz 6706 oil of enzymes of phenolic and general metabolism in barely shoots grown in the dark or under low of high intensity light. **Plant Physiology**, 65, 234–238, 1980.

BONILLA, J. et al. Physical, structural antimicrobial properties of polyvinyl alcohol-chitosan biodegradable films. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 463–470, 2014.

BORRIN, T. R. et al. Curcumin-loaded nanoemulsions produced by the emulsion inversion point (EIP) method: Na evaluation of process parameters and physico-chemical stability. **Journal of Food Engineering**, v.169, p. 1-9, 2016.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL, I. M. et al. Polysaccharide-based multilayered antimicrobial edible coating enhances quality of fresh-cut papaya. **Food Science and Technology**, v. 47, p. 39-45, 2012.

CAETANO, K. S. et al. Characterization of active biodegradable films based on cassava starch and natural compounds. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 16, p. 138–147, 2018.

CAMPOS, C. A. et al. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, p. 849-875, 2011.

CAMPOS-MARTÍNEZ, M. G. et al. Antagonistic yeasts with potential to control *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. and *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds on avocado fruits. **Crop Protection**, v. 89, p.101-104, 2016.

CANNON P. F. et al. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology**, v.73, p.181–213, 2012.

CAZON, P. et al. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**, v.68, 136-148, 2017.

CHANG, Y. et al. Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). **Food Chemistry**, v.172, p. 298–304, 2015.

CHEN, H. et al. Preparation, characterization, and properties of chitosan films with cinnamaldehyde nanoemulsions **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 662-671, 2016.

CHEUNG, R. et al. Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications. **Marine Drugs**, v.13, p. 51-56, 2015.

CHUTICHUDET, B., CHUTICHUDET, P. Effects of chitosan or calcium chloride on external postharvest qualities and shelf-life of ‘Holland’ papaya fruit. **Journal Agriculturae Science**, v. 6, n. 11, p. 1602014.

COSTA, E. M. et al. Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens. **Anaerobe**, v.18, p.305–309, 2012.

DAMM U. et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v.73, p. 37–114, 2012.

DANTAS, R. L. et al. Changes during maturation in the bioactive compounds and antioxidant activity of *Opuntia stricta* (haw.) Fruits. **ACTA HORTICULTURAE**. v. 1067, p. 159 – 165. 2015.

DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Mol. Plant Pathol.** v.13, p.414-430, 2012.

DE MORAES, J. O. et al. Scale-up of the production of cassava starch based films using tape-casting. **Journal of Food Engineering**, v.119, n.4, 800–808, 2013.

DIAAZ-MAROTO M. C. et al. Comparison of the volatile composition of wild fennel samples (*Foeniculum vulgare* Mill.) from Central Spain. **Journal Agricultural Food Chemistry**; v. 54, p. 6814–8, 2006.

DHALL, R. K. Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. **Crit. Rev. Food Sci**, v.53, p.435–450, 2013.

ESPITIA, P. et al. Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties – A review. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p.287–296, 2014.

ELSABEE, M. Z.; ABDOL, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 1819–1841, 2013.

FIGUEIREDO NETO, A. et al. Avaliação pós-colheita de mamão variedade ‘Formosa’ submetido a danos mecânicos e ensaios de compressão durante o armazenamento. **Revista Ciências Técnicas Agropecuárias**, v. 22, p. 5-10, 2013.

FOSCACHES, C. A. L. et al. Logística de frutas, legumes e verduras (FLV): um estudo sobre embalagem, armazenagem e transporte em pequenas cidades brasileiras. **Informações Econômicas**, v. 42, p. 37-46. 2012.

FRANCIS, F. J. **Analysis of anthocyanins**. In: MARKAKIS, P. (Ed.), Anthocyanins as food colors. New York: Academic Press, p. 181 – 207. 1982

GALGANO, F. et al. Biodegradable packaging and edible coating for fresh – cut fruits and vegetables. **Italian Journal Food Science**, v. 27, p. 1-20, 2015.

GALVAN MARQUEZ, I. et al. Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan. **International Journal of Food Microbiology**, v.164, p.108–112, 2013.

GARG, C. et al. Efficacy and safety studies of *Foeniculum vulgare* through evaluation of toxicological and standardisation parameters. **Int J Pharm Pharm Sci**, v.2, p.43-45, 2010.

GUERRA-ROSAS, M. I. et al. Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, v.52, p. 438-446, 2016.

GUERREIRO, A. C. et al. The effect of alginate-based edible coatings enriched with essential oils constituents on *Arbutus unedo* L. fresh fruit storage. **Postharvest Biology and Technology**, v.100, p.226-233, 2015.

GODOY, A. E. et al. Injúrias mecânicas e seus efeitos na qualidade de mamões Golden. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 682-691, 2010

GOY, R. C., BRITTO, D., ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros**, v. 19, p. 241-247, 2009.

GOL, N. B., CHAUDHARI, M. L., RAO, T. R. Effect of edible coatings on quality and shelf life of carambola (*Averrhoa carambola* L.) fruit during storage. **Journal of Food Science and Technology**, v.52, p. 78–91, 2015.

GOMES, C.; MOREIRA, R. G.; CASTELL-PEREZ, E. Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles with entrapped trans-cinnamaldehyde and eugenol for antimicrobial delivery applications. **Journal of Food Science**, v.76, p.16-24, 2011.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J-L. Edible Wheat Gluten Films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v.57, n.1, p.190-195, 1992.

GROSS, M. et al. The inheritance of volatile phenylpropenes in bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill: var. *vulgare* Apiaceae) chemotypes and their distribution within the plant. **Biochem. Syst. Ecol.** v. 37, p.308–316, 2009.

GUTIÉRREZ, T. J. et al. Physico-chemical properties of edible films derived from native and phosphorylated cassava and cassava starches. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 3, p.1–8, 2015.

HARTUNG, W. The evolution of abscisic acid (ABA) and ABA function in lower plants, fungi and lichen, **Funct. Plant Biol**, v.37, p.806–812, 2010.

HE, W.; HUANG, B. A review of chemistry and bioactivities of a medicinal spice: *Foeniculum vulgare*. **Journal Medicinal Plants Res.** v.5, p.595–3600, 2011.

HONG, K. et al. Transcriptome characterization and expression profiles of the related defense genes in postharvest mango fruit against *Colletotrichum gloeosporioides*. **Gene**, v.576, p. 275–283, 2016.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. Procedimentos e Determinações Gerais. In: **Métodos físicoquímicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. p. 98 – 105, 2005..

JAGTAP, U. B, BAPAT, V. A. Artocarpus: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal Ethnopharmacol.** v. 27, n. 2, p. 142-66, 2010. .

JIMENEZ, A. et al. Edible and biodegradable starch films: **a review. Food Bioprocess Technology**, v.5, p. 2058 - 2076, 2012.

JONES, A. M. P. et al. Identification of pro-vitamin A carotenoid-rich cultivars of breadfruit (Artocarpus, Moraceae). *Journal of Food Composition and Analysis*, v.31, p. 51-61, 2013a.

JONES, A. M. P. et al. Morphological diversity in breadfruit (Artocarpus, Moraceae): insights into domestication, conservation, and cultivar identification. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 60, p. 175-192, 2013b.

KANATT, S. R. et al. Active chitosan–polyvinylalcohol films with natural extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 29, p. 290–297, 2012.

KAMLE, M. et al. Identification and phylogenetic correlation among *Colletotrichum gloeosporioides* pathogeno anthracnose for mango. **Agricultural Biotechnology**, v. p, 285–287, 2013.

KIENZLE, S. et al. Harvest maturity detection for ‘Nam Dokmai #4’ mango fruit (*Mangifera indica* L.) in consideration of long supply chains. **Postharvest Biology and Technology**, v. 72 p. 64–75, 2012.

KRAJEWSKA, B.; WYDRO, P.; JANCZYK, A. Probing the modes of antibacterial activity of chitosan. Effects of pH and molecular weight on chitosan interactions with membrane lipids in Langmuir films. **Biomacromolecules**, v.12, p.4144–4152, 2011.

KONG, M. et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, p.51–63, 2010.

LATCHOUMIA, J. N. et al. Composition and growth of seedless breadfruit *Artocarpus altilis* naturalized in the Caribbean. **Scientia Horticulturae**, v. 175, p.187–192, 2014.

LEACH, H. W., MC COWEN, L. D., & SCHUCH, T. J. Structure of the starch granule. I. Swelling and solubility patterns of various starches. **Cereal Chemistry**, 36, 534–544, 1959.

LIANG, R. et al. Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p.7548-7555, 2012.

LIMA, R. P. et al. Using digital image processing for evaluation of translucency in fresh-cut 'Pérola' pineapple coated with biofilms. **Acta Horticulturae**, v. 1, p. 311-318, 2016.

LIRA, R. S.; BATISTA, J. L. Aspectos biológicos de *Chrysoperla externa* alimentados com pulgões da ervadoce. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.6, p.20-35, 2006.

LIU, Y. S.; Chen, G. Study on the application in paper barrier coatings. **China Pulp & Paper**, v. 30, p. 1-6, 2001.

LIU, Y. et al. Crop productivity, yield and seasonality of breadfruit (*Artocarpus* spp., Moraceae). **Fruits**, v. 69, p. 345-361, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2. ed. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, 2008.

MA, H. L. et al Properties of extruded expandable breadfruit products. **Food Science and Technology**, v. 46, p. 326-334, 2012.

MANSILLA, A. Y. et al. Evidence on antimicrobial properties and mode of action of a chitosan obtained from crustacean exoskeletons on *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p.6957–6966, 2013.

MAOR, S.; HASKIN, H.; LEVI-KEDMI, A. Sharon, in planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*, *Appl. Environ. Microbiology*, v. 70, p.1852–1854, 2004.

MARAN, J. P. et al. Development of model for mechanical properties of tapioca starch based edible films. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 159–168, 2013.

MARTIÑON, M. E. et al. Development of a multilayered antimicrobial edible coating for shelflife extension of fresh-cut cantaloupe (*Cucumis melo* L.) stored at 4°C. **Food Science and Technology**, v. 56, p. 341-350, 2014.

MANTILLA, N. et al. Multilayered antimicrobial edible coating and its effect on quality and shelf-life of fresh-cut pineapple (*Ananas comosus*). **Journal of Food Science Technology**, v.51, p. 37-43, 2013.

MARTINEZ, C. Y.; CUEVAS, F. **Evaluación de la calidad culinaria y molinera del arroz**. Guia del estudio. Cali: CIAT, 1989. 75 p.

MATUSINSKY, P. et al. Antifungal effect of five essential oils against important pathogenic fungi of cereals. **Ind. Crop. Prod.**, v.67, p.208–215, 2015.

MAVUSO, Z. S.; VAN NIEKERK, J. M. Development of a more effective postharvest treatment for the control of postharvest disease of avocado fruit. In: **South African Avocado Growers' Association Yearbook**, v. 36, p. 23-26, 2013.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; PARK, Y. Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.49, p.48-67, 2009.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 285-330, 2011.

MESFIN, M.; ASRES, K.; SHIBESHI, W. Evaluation of anxiolytic activity of the essential oil of the aerial part of *Foeniculum vulgare* Miller in mice **BMC Complement. Altern.**, v. 14, p. 310, 2014.

MITELUT, A. C. et al. Sustainable alternative for food packaging: Chitosan biopolymer-a review. **AgroLife Scientific Journal**, v. 4, p.52–61, 2015.

MUÑOZ-BONILLA, A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. Polymeric materials with antimicrobial activity. **Progress in Polymer Science**, v. 37, p. 281-339, 2012.

NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol**, v. 22, p. 867-880, 1981.

NAGATA, M.; YAMASHITA, I. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. **Journal of Japanese Society of Food Science and Technology**, v. 39, p. 925 – 928. 1992.

NAKAMURA, N. et al. Effects of temperature and gas composition on respiratory behaviour of tree-ripe ‘Irwin’ mango. **Acta Horticulturae**, v. 600, p. 425–429, 2003.

NEJADMANSOURI, M. et al. Physicochemical properties and storage stability of ultrasound mediated WPI-stabilized fish oil nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v.61, p. 801-811, 2016.

NWOKOCHA, C. R. et al. Young, Possible mechanisms of action of the aqueous extract of *Artocarpus altilis* (breadfruit) leaves in producing hypotension in normotensive Sprague-Dawley rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, p. 1096-1102, 2012.

NWOKOCHA, L. M.; WILLIAMS, P. A. Comparative study of physicochemical properties of breadfruit (*Artocarpus altilis*) and white yam starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 294–302, 2011.

NUNES-NESI, A.; FERNIE, A. R.; STITT, M. Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. **Molecular Plant**, Shanghai, v.3, p.973-996, 2010.

O’CONNELL R. J. et al. Life-style transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, v. 44, p. 160-167, 2012.

ONG, M.K., KAZI, F.K., FORNEY, C.F., ALI, A. Effect of gaseous ozone on papaya anthracnose. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p.2996–3005, 2013.

ONG, M. K.; ALI, A. Antifungal action of ozone against *Colletotrichum gloeosporioides* and control of papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**, v. 100, p.113–119, 2015.

OTONI, C. G. et al. Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. **Food Hydrocolloids**, v.41, p.188-194, 2014a.

OTONI, C. G. et al. Edible films from methylcellulose and nanoemulsions of clove bud (*Syzygium aromaticum*) and oregano (*Origanum vulgare*) essential oils as shelf life extenders for sliced read. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 5214-5219, 2014b.

PAGLIARULO, C. et al. Preservation of strawberries with an antifungal edible coating using peony extracts in chitosan. **Food and Bioprocess Technology**, v.9, p.1951–1960, 2016.

PALMA-GUERRERO, J. et al. Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. **Molecular Microbiology**, v.75, p. 1021–1032, 2010.

PAREJO, I. et al. Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*foeniculum vulgare*) using liquid chromatography negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal Agriculture Food Chemical**, v.52, p.3679-3687, 2004.

PARK, S. C.; NAH, J.-W.; PARK, Y. pH-dependent mode of antibacterial actions of low molecular weight water-soluble chitosan (LMWSC) against various pathogens. **Macromolecular Research**, v.19, p.853–860, 2011.

PAVELA, R. et al. Crop New knowledge for yield, composition and insecticidal activity of essential oils obtained from the aerial parts or seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) **Industrial Crops and Products**, v.83, p.275–282, 2016.

PERDONES, A. et al. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan-cinnamon leaf oil films as affected by oleic acid. **Food Hydrocolloids**, v.36, p.256-264, 2014.

PRIYATNO, T. P. et al. Inactivation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase A causes delayed appressorium formation and reduced pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Sci. World J.**, p.1–12, 2012.

POVERENOV, E. et al. Layer-by-layer electrostatic deposition of edible coating on fresh cut melon model: anticipated and unexpected effects of alginate-chitosan combination. **Food and Bioprocess Technology**, v.7, p.1424–1432, 2014.

PRUSKY, D.; LICHTER, A. Activation of quiescent infections by post-harvest pathogens during transition from biotrophic to the necrotrophic stage. *Fed. Eur. Microbiol. Soc*, v. 268, p. 1-8, 2007.

RAMALHO, F. S. et al. Assessment of fennel aphids (Hemiptera: Aphididae) and their predators in fennel intercropped with cotton with colored fibers. **Journal Econ. Entomology**, v. 105, p. 113–119, 2012.

RIBES, S. et al. Influence of emulsifier type on the antifungal activity of cinnamon leaf, lemon and bergamot oil nanoemulsions against *Aspergillus niger*. **Food Control**, xxx, p. 1-12, 2016.

ROBINSON, M.; RIOV, J; SHARON, A. Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*, *Appl. Environ. Microbiology*, v. 64, p. 5030–5032, 1998.

ROCKENBACH, M. F. et al. Histological and proteomics analysis of apple defense responses to the development of *Colletotrichum gloeosporioides* on leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 89, p. 97-107, 2015.

RODRIGUES, A. G. M. et al. Physiology and postharvest conservation of 'Paluma' guava under coatings using Jack fruit seed-based starch. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, p. 352-360, 2018.

ROSELLO, J. et al. Antifungal activity and potential use of essential oils against *Fusarium culmorum* and *Fusarium verticillioides*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.18, p.359-367, 2015.

SANCHEZ-ORTEGA, I. et al. Characterization and antimicrobial effect of starch-based edible coating suspensions. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 906-913, 2016.

SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p.401-407.2013.

SANTACRUZ, S.; RIVADENEIRA, C.; CASTRO, M. Edible films based on starch and chitosan. Effect of starch source and concentration, plasticizer, surfactant's hydrophobic tail and mechanical treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 89-94, 2015.

SANTOS, T. M. et al. Physical properties of cassava starch-carnauba wax emulsion films as affected by component proportions. *Int. J. Genomics*, v. 49, n. 9, p. 2045–2051, 2014.

SCHREIBER, S. B. et al. Introduction of primary antioxidant activity to chitosan for application as a multifunctional food packaging material. **Food Hydrocolloids**, v.33, p.207–214, 2013.

SHADMANI, N. et al. Chilling injury incidence and antioxidant enzyme activities of *Carica papaya* L. 'Frangi' as influenced by postharvest hot water treatment and storage temperature. **Postharvest Biology and Technology**, v. 99, p. 114–119, 2015.

SEVERINO, R. et al. Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* on green beans. **Food Control**, v.50, p. 215-222, 2015.

SIVAKUMAR, D.; WALL, M. M. Papaya fruit quality management during the postharvest supply chain. **Food Reviews International**, Philadelphia, v.29, p.24-48, 2013.

SINGH, N.; SANDHU, K. S.; KAUER, M. Characterization of starches separated from indian chickpea (*Cicer arietinum L*) cultivars. **Journal off Food Enginnering**, v. 63, p. 441 – 449, 2004.

SIPAHI, R.E. et al. Improved multilayered antimicrobial alginate-based edible coating extends the shelf life of fresh-cut watermelon (*Citrullus lanatus*). **Food Science and Technology**, v.51, 9-15, 2013.

SOLANS, C.; SOLE, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, p.246–254,2012.

SOLIVA-FORTUNY, R. Polysaccharide coatings extend fresh-cut fruit shelf life. Emerging **Food Research and Development Report**, v.21, p.1-2, 2010.

SOUSA, F. A.; ROCHA, R. H. C.; SILVA, H. S. Manga “Tommy Atkins” submetida a injúrias mecânicas pós-colheita. **Revista Verde, Mossoró**, v. 8, p. 14-21, 2013.

SOUZA, D. S. et al. Preparation of instant flour from the pulp of breadfruit (*Artocarpus altilis*). **Ciencia rural**, v. 42, p. 1123-1129, 2012.

SOUZA, C. T. et al. Determination and evaluation of the mineral composition of breadfruit (*Artocarpus altilis*) using multivariate analysis technique. **Microchemical Journal**, v. 128, p. 1-18, 2016.

SHOJAEE-ALIABADI, S. et al. Characterization of k-carrageenan films incorporated plant essential oils with improved antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v.101, p.582-591, 2014.

SOROUDI, A., JAKUBOWICZ, I. Recycling of bioplastics, their blends and biocomposites: a review. *Europen Polymer Journal*, v. 49, p. 2839-2858, 2013.

SILVA, R. S. et al. Influence of biodegradable coatings on the volatiles profile of fresh-cut -Paluma guava. **Acta Horticulturae**, v. 1, p. 319-326, 2016.

SRIPONG, K., JITAREERAT, P., UTHAIRATANAKIJ, A., SRILAONG, V., WONGS-AREE, C., TSUYUMU, S., KATO, ME. Effects of hot water, UV-C and modified coconut oil treatments on suppression of anthracnose disease and maintenance

of quality in harvested mango cv. 'Chok-Anan'. **Journal Food Nutrition Science**, v. 3, n. 1–2, p.1–8, 2015.

SUMAN, S. et al. Chitosan inhibits premature browning in ground beef. **Journal of Meat Science**, v. 88, p. 512-516, 2011

TELICI, I. DEMIRTAS, I.; SAHINB, A. Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity. **Industrial Crops and Products**, v. 30, p.126–130, 2009.

THAKUR, V. K., VOICU, S. I. Recent advances in cellulose and chitosan based membranes for water purification: A concise review. **Carbohydrate Polymers**, v.146, p.148–165, 2016.

TOZZE, JÚNIOR, H. J.; MELLO, M. B. A.; MASSOLA JÚNIOR. N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathol**, v. 32, p. 77-79, 2006.

TREVISAN, M. J. et al. Aplicação de 1-metilciclopropeno associado ao etileno para minimizar seus efeitos na inibição do amadurecimento do mamão 'Golden'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 384-390, 2013.

TURI, C. E. et al. Breadfruit (*Artocarpus altilis* and hybrids): A Traditional Crop with the Potential to Prevent Hunger and Mitigate Diabetes in Oceania. **Trends in Food Science e Technology**, v. 45, p. 264-272, 2015.

VALENCIA-CHAMORRO, S. A. et al. Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and Vegetables: a review. Crit. **Rev. Food Sci**, v.51, p.872–900, 2013.

VELIKOVA, V. et al. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, p. 59–66, 2000.

VIJ, T.; PRASHAR, Y. A review on medicinal properties of *Carica papaya* Linn. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, p. 1-6, 2015.

WEIR B.S.; JOHNSTON P. R.; DAMM U. The Colletotrichum gloeosporioides species complex. **Studies in Mycology**, v.73, p.115- 2012.

WORRELL, D. B.; CARRINGTON, C. M. S.; HUBER, D. J. The use of low temperature and coatings to maintain storage quality on breadfruit, *Artocarpus altilis* (Parks.) Fosb. **Postharvest Biology. Technology**, v. 25, p. 33–40, 2002.

XU, R. et al. Measure of mechanical impacts in commercial blueberry packing lines and potential damage to blueberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.110, p.103–113, 2015.

ZOBEL, H. F. X. Ray analysis of starches granules. In R. L. Whistler (Ed.), **Carbohydrate chemistry**, p. 109–113, 1964.

ZHOU A. et al. Efficacy of *Pichia membranaefaciens* combined with chitosan against *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits and possible modes of Action. **Biological Control**, v. 96, p.39–47, 2016.

ZHU, X., LI, X., CHEN, W., LU, W., MAO, J., LIU, T. Molecular cloning, characterization and expression analysis of CpCBF2 gene in harvested papaya fruit under temperature stresses. *Electron. Journal Biotechnology*, v. 16, n. 4, p.1–10, 2013.

ZÚNIGA, G. E. et al. Effect of ionizing energy on extracts of *Quillaja saponaria* to be used as an antimicrobial agent on irradiated edible coating for fresh strawberries. *Radiat. Phys. Chem*, v.81, p.64–69, 2012.

5. RESULTADOS

Com os resultados obtidos neste trabalho foi possível a produção de três artigos e uma patente. Os quais já se encontram nas normais dos periódicos e patente.

Patente: Processo e produto em multicamadas biodegradáveis com ação funcional na conservação da qualidade pós colheita de frutos.

Artigo 1: Breadfruit Starch and Chitosan with Nanoemulsion of Essential Oil Enhances the Postharvest Life of Papaya.

Artigo 2: Properties of a biodegradable polymer bilayer coating based on breadfruit starch, chitosan and nanodispersion of fennel essential oil.

Artigo 2: Coating of Breadfruit Starch, Chitosan in a Bilayer with Nanoemulsion of Fennel Essential Oil and Sodium Alginate reduces the Metabolic Rate e Maintain Functional Quality of Golden Papaya.



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102017022068-0 A2



(22) Data do Depósito: 13/10/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 07/05/2019

(54) **Título:** PROCESSO E PRODUTO EM MULTICAMADAS BIODEGRADÁVEIS COM AÇÃO FUNCIONAL NA CONSERVAÇÃO DA QUALIDADE PÓS COLHEITA DE FRUTOS

(51) **Int. Cl.:** A23B 7/16.

(52) **CPC:** A23B 7/16.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA.

(72) **Inventor(es):** CRISTIANE RODRIGUES DE ARAÚJO PENNA; SILVANDA DE MELO SILVA; RENATO PEREIRA LIMA; RANDOLPH MARK BEAUDRY.

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se ao produto e processo para obtenção de recobrimentos em multicamadas biodegradáveis, compostas por, na primeira camada, amido de fruta pão (*Artocarpus altilis*) e quitosana, e na segunda camada por alginato, óleo essencial de erva doce na forma de nanoemulsão e Tween 40®, sendo incorporado em ambas as camadas glicerol. Este produto tem a função de manter a qualidade e a sanidade pós-colheita de frutos tropicais. A combinação destes constituintes em multicamadas torna o recobrimento eficaz em reduzir a taxa metabólica e minimizar o desenvolvimento de fitopatogênicos que consistem na principal causa das elevadas perdas pós-colheita de frutos e hortaliças e de enormes prejuízos para a produção agrícola. A aplicação deste processo e produto é uma alternativa ecologicamente correta, viável economicamente, uma vez que as matérias primas são amplamente disponíveis na natureza, tecnologicamente limpa e sustentável, além de ser de fácil aplicação em frutos, sendo também eficiente na redução da taxa metabólica e o controle de doenças pós colheita causadas pela ação de micro-organismos fitopatogênicos de ampla ocorrência em frutos e hortaliças.



**“PROCESSO E PRODUTO EM MULTICAMADAS BIODEGRADÁVEIS COM AÇÃO
FUNCIONAL NA CONSERVAÇÃO DA QUALIDADE PÓS COLHEITA DE FRUTOS”**

Campo da Invenção

[001] A patente de invenção é processo e produto de multicamadas ou multifilmes, formados por camadas sobrepostas obtidas a partir matérias primas biodegradáveis, como polissacarídeos e óleos essenciais, que agem na preservação da qualidade de frutos após colheita. A invenção trata do processo de elaboração de recobrimentos formando multicamadas (multifilmes), em vista que, o uso de recobrimentos, é uma alternativa viável e efetiva na manutenção da qualidade de frutos que apresentam elevada perecibilidade.

[002] O uso de recobrimentos na manutenção da qualidade vem sendo cada vez mais uma alternativa viável para manutenção da qualidade pós colheita de frutos. Sua aplicabilidade está associada a natureza dos frutos tropicais, de serem, em geral, altamente perecíveis, apresentando elevada taxa metabólica, acarretando assim, em amadurecimento rápido através de reações bioquímicas aceleradas. Além disso, alguns frutos apresentam características físicas que os torna sensíveis danos causados pelo manuseio e acondicionamento inadequados. Esses danos provocam aumento da taxa metabólica do vegetal (maiores taxas respiratória), diminuindo assim, a vida útil pós colheita, atingindo a senescência mais rapidamente; o uso de diversas matérias primas amplamente disponíveis na natureza com características e funcionalidades distintas, que agregam valor, permitindo retardar a maturação e ampliar vida útil pós colheita dos frutos. O uso de embalagens comerciais na conservação de frutos, comumente está associado à aplicação de materiais sintéticos, a partir de polímeros. No entanto, materiais plásticos convencionais, produzidos a partir de polímeros sintéticos, provocam graves problemas ambientais, devido ao longo tempo necessário para sua degradação, por ter como característica alta massa molar e hidrofóbicos, dificultando assim a ação de microrganismos e enzimas em sua decomposição, além de também gerarem impacto ambiental pelos processos utilizados para sua reciclagem. A utilização recobrimentos biodegradáveis vem a ser uma alternativa viável, sem efeito nocivo aos frutos que podem ser considerados sistemas de embalagens alternativas,

que não provocam danos ao meio ambiente, consistindo, portanto, em tecnologia inócua à saúde, limpa e sustentável. Assim, o uso de materiais biodegradáveis como os polissacarídeos a base de matérias primas amplamente disponíveis na natureza, e óleos essenciais tem sido explorado em diversos trabalhos científicos. As utilizações de matérias primas diversas, podem proporcionar a formulação de inúmeros recobrimentos com propriedades de manter a qualidade e segurança alimentar do produto, a depender do tipo de matérias primas utilizadas, bem como, o tipo de material, o processo através do qual o mesmo é produzido, bem como a finalidade que terá tal recobrimento. O uso de polímeros ou até mesmo polissacarídeos, associados ou não com outras matrizes distintas, como óleos essenciais, pode representar diversificação, valorização de matérias primas abundantes de produção local e oriundas da agricultura, segurança alimentar, sustentabilidade e funcionalidade para recobrimentos/filmes biodegradáveis.

[003] Esta forma mais eficiente de recobrimento surge como alternativa viável, inédita e eficiente para manutenção da qualidade de frutos, sobretudo os que apresentam características físicas peculiares, como a presença de cascas delicadas, susceptíveis a danos pelos aditivos associados à matriz e até mesmo os que são comercializados na forma minimamente processados. Esta nova tecnologia denominada multicamada é ideal para aplicação em frutos que apresentam essas características. A multicamadas compostas por amido de fruta pão, quitosana, alginato e óleo essencial de erva doce (*Foeniculum vulgare*), é um mecanismo de intervenção de barreira com propriedades de redução da taxa metabólica e controle do desenvolvimento de micro-organismos, tornando o fruto mais atrativo e conferindo proteção contra desordens fisiológicas resultantes do contato direto desse ingrediente ativo diretamente ao fruto, além, de inibir os mecanismos bioquímicos de deterioração dos frutos, mantendo a qualidade. Este produto ainda não foi estudado ou está disponível na literatura na condição da formulação e processo de elaboração propostos, que utiliza matérias primas descritas acima e nem registrado como processo/método viável; tecnicamente este método é de fácil aplicação, apresenta baixo custo financeiro, boa aderência ao fruto, além de apresentar excelente efeito

protetor e de manutenção da qualidade frutos. Além disso, as multicamadas compostas por filmes oriundos da composição do amido de fruta pão, quitosana (primeira camada), alginato e óleo essencial de erva doce como nanoemulsão uniforme (segunda camada), apresenta características funcionais e permeabilidade adequadas aos gases, permitindo a redução da taxa respiratória e consequente redução da taxa metabólica, e de permeabilidade adequada ao vapor d'água, as quais são essenciais na manutenção da qualidade de frutos de diversas naturezas.

[004] Outro fator que justifica o uso deste tipo de alternativa é o controle de dano causado por fungos, a exemplo, o *Colletotrichum gloeosporioides* que é agente causal de doença pós colheita em diversos frutos tropicais, reconhecido como causador da antracnose. A utilização de multicamadas compostas por amido de fruta pão, quitosana, alginato e óleo essencial de erva doce (*Foeniculum vulgare*), estes dois últimos incorporados na forma de nanoemulsão, é um mecanismo de dispersão amplo e uniforme de nanopartículas de óleo essencial que proporciona a intervenção de barreira deste ingrediente ativo com propriedades antifúngicas, sem que este possa causar desordens fisiológicas, problema que regularmente ocorre em frutos tropicais pela aplicação direta na superfície de compostos antifúngicos naturais. O desenvolvimento de filmes e recobrimentos vem sendo bastante estudado, utilizando matérias primas de ocorrência regional, como vários tipos de amido (macaxeira, batata, jaca), óleos essenciais (laranja doce, orégano, capim limão) e quitosana de forma isolada. Entretanto, não tem sido reportado o uso de amido de fruta pão na formulação de multicamadas compostas também por quitosana, alginato e óleo essencial de erva doce uniformemente nanoparticulado. Este mecanismo por ser viável tecnicamente, apresentar baixo custo financeiro, boa aderência entre as camadas, e excelente poder antifúngico, sem causar as desordens fisiológicas que geralmente acometem os frutos. A aplicação da multicamada é perfeitamente aplicável e recomendada para frutos por ser uma técnica de fácil aderência, que permite ser aplicada à frio na casca desta matriz alimentar e por manter a qualidade durante o armazenamento sem que resulte em qualquer desordem fisiológica aos frutos.

Antecedentes da Invenção

[005] A patente PI 0515797-8 A8, intitulada, “Filmes multicamadas com propriedades aperfeiçoadas”, com data de 05 de agosto de 2008, que se refere a adesão a quente e/ou resistência de selagem para formação de um filme multicamada. Nesta patente o processo de obtenção foi usado como foco, de multicamadas formadas de homopolímeros, o qual não foi aplicado em frutos, diferente do aqui proposto nesta invenção.

[006] A patente PI 0510517-0 A2, intitulada, “Material em multicamadas, particularmente para embalar produtos sensíveis ao oxigênio”, com data de 30 de outubro de 2007. A presente invenção refere-se a um material em multicamadas compreendendo pelo menos a seguinte sequência de camadas: a) uma camada de barreira para gás à base de EVOH; b) uma camada promotora de adesão à base de pelo menos um polímero modificado com anidrido; c) uma camada absorvedora de oxigênio composta de pelo menos um absorvedor de oxigênio polimérico não-particulado, em que a espessura total da (s) camada (s) promotora (s) de adesão é, de preferência, e também a um processo para sua produção e a seu uso. Diferente do que está proposto na formação de multicamada deste processo.

[007] A patente PI 0411457-4 A2, intitulada “Método para o acondicionamento de carne ou frutos do mar e filme de multicamadas”, de 18 de julho de 2006, refere-se ao uso de um filme de poliolefina compreendendo um polímero de polipropileno e um polímero de polietileno para o acondicionamento de produto alimentício fresco. Esta patente apresenta características distintas do proposto neste processo, pois, no processo aqui apresentado são utilizados ingredientes biodegradáveis e comestíveis no lugar de polímero polipropileno.

[008] A patente PI 0108383-0 A2, intitulada “Composição de revestimento de barreira a gases e material para embalagem em multicamadas”, de 05 de novembro de 2002, denota de multicamadas formadas de poliamina, diferente do óleo d erva doce nanoparticulado proposto neste processo e produto.

[009] A patente PI 1000797-0 A2, intitulada “Composição de filme multicamadas para embalagem de palmito, de 07 de janeiro de 2012, refere-se mais

particularmente a uma composição (identificada com C) notadamente desenvolvida para ser utilizada na fabricação de embalagens flexíveis (identificada como 1) para acondicionamento de palmito, no qual a fabricação do plástico propriamente dito é feita por método convencional de extrusão de polímeros (polietileno, poliestireno, poliamida, poliéster, alumínio, polipropileno, etc;), sendo que, a combinação destes elementos com um número específico de camadas de espessuras diferentes resulta em embalagem com características e propriedades que atendem às especificações necessárias para acondicionamento adequado do palmito. Este filme de multicamada é destinado à utilização para alimento processado, diferente do proposto neste processo que é aplicado para fruto fresco, utilizando matéria prima natural e biodegradável.

[010] A patente BR 10 2017 001571 8 A2, intitulada “Compósito de papel almofada multicamadas para conservação de produtos alimentícios”, cosméticos e produtos afins, de 23 de maio de 2017, aborda a composição de multicamadas formada por papel Kraft e amanteigado, para conservação de alimentos e produtos cosméticos, utilizado para vedar vazamento de conteúdos gordurosos, pastosos ou semilíquidos dos referidos produtos, desta forma, mantendo as características originais dos produtos, além de protegê-los contra vibrações que possam causar-lhes dano. Esse é tratado por processo exclusivo através de cilindro gravado a laser pode ser utilizado tanto como embalagem externa como invólucro sobreposto aos produtos. Diferentemente das matérias primas biodegradáveis que são aqui propostas e também para fins distintos do produto.

[011] Patente BR 10 2012 008550 0 A2, intitulada “Filmes multicamadas de liberação controlada de substâncias voláteis adsorvidas em um suporte sólido e uso”, de 23 de novembro de 2013, aborda dispositivos multicamadas de liberação controlada de substâncias líquidas voláteis e sua obtenção. Os filmes multicamadas são constituídos por três camadas de polímero natural e biodegradável (quitosana), sendo que a segunda camada contém uma substância líquida volátil adsorvida em suporte sólido (amido ou talco). Os filmes foram testados contra *Leishmania amazonensis* e apresentaram atividade antileishmanial, diferente do processo, produto e finalidade aqui apresentados.

[012] Patente PI 8705773-5 A2, intitulada “Filme de multicamadas de alta permeabilidade para empacotamento, embalagem altamente permeável à umidade e gases para alimentos, e embalagem para queijos de crosta moldada”. Aborda o uso de multicamadas para alimentos de origem animal, diferente do proposto em nosso produto, em termos de composição e fins de utilização.

[013] Na proposta aqui apresentada, portanto, esta técnica de inibição antifúngica e de manutenção da qualidade de frutos, aplicada na forma de constituintes distribuídos nas multicamadas, ainda não foi registrada como processo patenteado, no que refere ao processo que possa apresentar inibição do desenvolvimento de antracnose causada pelo *Colletotrichum gloeosporioides* pela ação de ingrediente ativo, o óleo de erva doce na camada externa, disperso uniformemente na forma de nanopartículas. O que aqui se apresenta é um produto oriundo de etapas de processo que associa componentes adicionados em ordens específicas, os quais estão presentes nas multicamadas com diversas finalidades e efeitos positivos à conservação pós-colheita do fruto e inovações.

[014] A seguir, estão listadas algumas patentes mais relevantes que apresentam produtos que utilizam os componentes propostos para as multicamadas presente neste documento.

[015] A patente BR PI 0621953-5 A2 intitulada “Composição sólida, seca, eficaz no controle biológico de *Colletotrichum gloeosporioides*; método para produção de método para o controle biológico da enfermidade causada por *Colletotrichum gloeosporioides* e método para reduzir a perda de peso durante a armazenagem de manga” de 16 de outubro de 2011, refere-se ao processo de controle biológico do *Colletotrichum gloeosporioides*, pelo *Rhodotorula minuta* e também descreve igualmente o método que resultou em redução da perda de peso durante o armazenamento da manga. Contudo, o método utilizado nessa patente é diferente do proposto neste processo, pois, essa patente utiliza como antifúngico *Rhodotorula minuta* como agente antifúngico e não a quitosana e óleo essencial de erva doce, além de outra matriz de suporte, ao contrário do processo aqui apresentado.

[016] A patente BR 102014008940 – 3, intitulada: “Uso de óleo essencial de erva-doce (*Foeniculum vulgare*) como inibidor do escurecimento para óleos e gorduras vegetais” com data de 14 de abril de 2014, refere-se ao uso de óleo essencial de erva doce como inibidor de escurecimento de óleos e gorduras vegetais. Diferente do que está proposto neste processo, essa patente usa o óleo essencial de erva doce com fins tecnológicos e não antifúngicos.

[017] A patente BR PI 0519404-0 A2, intitulada: “Barreiras antimicrobianas, sistemas e métodos formados a partir de estruturas poliméricas hidrofílicas tais como a quitosana”. Com data de 20 de dezembro de 2001, refere-se à elaboração de uma barreira antimicrobiana composta por quitosana com efeito de estancar, selar os estabilizar lesão tecidual, formar barreira antimicrobiana, formar curativo antiviral. A quitosana dessa patente apresenta efeito antimicrobiano. No entanto, diferente do proposto neste processo que usa o mesmo nanoparticulado na camada externa do recobrimento com efeito antifúngico em frutos.

[018] A patente BR 10 2012 025629 A2, intitulada “Fórmula de resinas poliolefinicas com amido de milho e pró-degradante para fabricação de filmes plásticos biodegradáveis” de 12 de agosto de 2014, fórmula de mistura de resinas plásticas e resinas bioplásticas derivadas de fontes renováveis para a fabricação de filmes plásticos biodegradáveis utilizando uma mistura de resinas poliolefinicas de alta e/ou baixa densidade (incluindo polipropileno) com um aditivo pró-degradante (na forma de uma mistura de ácidos graxos e um metal de transição) e uma resina híbrida contendo uma mistura de polietileno e amido de milho (66% de amido de milho e 34% de polietileno linear de baixa densidade). Como resultado, obtém-se um composto plástico que é a um só tempo biodegradável, sustentável (porque inclui uma porcentagem de material derivado de fonte renovável) e com menor “carbon footprint” (menor emissão de CO₂ para a atmosfera durante o processo de fabricação da resina). Diferentemente do que é posposto nesse processo, a patente aqui apresentada usa amido de fruta pão, quitosana e óleo essencial de erva-doce, em formulação de multicamadas, que reduz a taxa metabólica (redução da taxa respiratória) e a utilização de substratos (sólidos solúveis), retardando o

amadurecimento, caracterizando-se como tecnologia limpa, eficiente, a partir de matérias primas naturais, inócuas e sustentáveis.

[019] A patente BR 11 2013 028404-8 A2, intitulada “Filmes de composições de amido-polímero-cera-óleo”, de 01 de março de 2017, são revelados filmes formados a partir de composições que compreendem amido termoplástico, polímeros termoplásticos, e óleos, ceras, ou combinações dos mesmos, nos quais o óleo, a cera, ou combinação estão dispersado (a)s em todo o polímero termoplástico.

[020] A patente PI 0704589-1 B1, intitulada “Filme biodegradável à base de amido e/ou fécula contendo ingredientes naturais antimicrobianos e seus usos”, de 01 de março de 2016. Essa invenção destina-se a um filme biodegradável à base de amido e/ou fécula elaborado com adição de ingredientes naturais antimicrobianos. Esse pedido, ainda, provê o uso desse filme biodegradável em embalagens ativas para produtos perecíveis e/ou na elaboração produtos para fins decorativos. Entretanto, essa difere do processo e finalidade aqui apresentados, no tocante à estruturação em multicamadas, a sequência de componentes em cada uma desta, de modo que na camada mais externa encontra-se dispersa uniformemente em nanopartículas um ingrediente ativo antimicrobiano, além do processo empregado na sua obtenção, bem como seu efeito benéfico no controle de doenças e retardo do amadurecimento e manutenção da qualidade de frutos tropicais na pós-colheita.

[021] A patente BR 11 2016 007493-9 A2, intitulada “Processo para preparação de emulsões lipídicas contínuas comestíveis sem emulsificante e emulsão contínua lipídica comestível”, de 01 de agosto de 2017. Processo para fabricação de emulsões lipídicas contínuas comestíveis compreendendo 25 a 60% em peso de gordura, e cuja emulsão pode ser fabricada sem emulsificante comum de mono e/ou diglicerídeos. O processo envolve estruturação da fase oleosa e estabilização da emulsão por meio de uma combinação de gordura em pó que compreende agente estruturante sólido e agente estruturante sólido misturado com o óleo da emulsão na forma líquida. O uso de emulsão no processo proposto tem finalidade e composição distintos ao aplicado neste processo.

Descrição da Invenção

[022] Produto e processo de multicamadas biodegradáveis com ação funcional na manutenção da qualidade pós colheita, ao qual consiste em filmes em multicamadas contendo ingredientes específicos em cada uma, cuja funcionalidade é decorrente do processo de obtenção deste produto, que resulta em efeito protetor da qualidade de frutos. A invenção poderá ser melhor compreendida através da seguinte descrição detalhada:

[023] Produto oriundo de matéria prima biodegradável, composto de polissacarídeos e óleo essencial de erva doce.

[024] Primeira camada – Amido de fruta pão (*Artocarpus altilis*) e dispersão de quitosana: Para o preparo da primeira camada foi utilizado amido obtido de fruta pão, plastificante e solução de quitosana. Para o preparo da primeira camada foi utilizado amido obtido de fruta pão, o qual foi pré processado em Ultra Turrax por 3 minutos consecutivos e levado ao aquecimento até gelatinização a 90°C com água destilada (A), em seguida foi feito arrefecimento até temperatura de 60°C e adicionado 0,5% de glicerol como plastificante e solução de quitosana (B), logo em seguida foi realizada a homogeneização manual de todos estes (C). Para melhor ação, a primeira camada foi novamente arrefecida a temperatura de 24°C e aplicado nos frutos por imersão (D), para conclusão desta primeira etapa os frutos pós recobertos com a primeira camada foram secos na condição ambiente 24°C e 72 % UR (umidade relativa), até total secagem da primeira camada (E).

[025] Segunda camada – preparação da dispersão uniforme da nanoemulsão (**Figura 4**). A segunda camada foi elaborada com suspensão composta de água destilada mais alginato, plastificante e óleo essencial de erva doce. A segunda camada – preparação da emulsão: A segunda camada foi elaborada com solução composta de água destilada mais alginato (0,5%) gelatinizado a 70°C (F) e arrefecida a 60°C para adição de 0,5% de glicerol e Tween 40[®] (G) e homogeneização manual (H). Esta solução foi arrefecida até temperatura de 40°C, parte foi utilizada (30% de solução) para adição do óleo essencial que foi realizado a saber: empregado força de cisalhamento com auxílio de Ultra Turrax (**Figura 4**) rpm por 3 minutos consecutivos, na solução a qual foi

adicionada o óleo gota a gota durante este processo. Com total incorporação do óleo o mesmo foi levado para ultrassom por 5 minutos consecutivos (**Figura 4**), a fim de diminuir o tamanho das partículas ao de nível de nanopartículas (I). Logo em seguida, a emulsão foi arrefecida a 24°C e aplicada nos frutos (J), que foram armazenados em também nesta temperatura K).

[026] Os frutos foram imersos na primeira camada por 60 segundos, em seguida, foram submetidos a secagem na condição ambiente UR (D), até completa secagem da primeira camada. Pós secagem, os frutos foram imersos na segunda camada (emulsão) também por 60 segundos (J). Em seguida, os frutos foram secos na condição ambiente e armazenados na condição ambiente (K).

[027] A **Figura 2** representa o fluxograma do processo de controle antifúngico *Colletotrichum gloeosporioides*.

[028] Para a elaboração dos meios de culturas foram utilizados os seguintes componentes: amido de fruta pão e quitosana como composição da primeira camada; alginato e óleo essencial de erva doce, como componentes da segunda camada e Tween 40[®] para dispensar a fase lipídica. Estes componentes enriqueceram o meio de cultura BDA (Agar Batata Dextrose). O *Colletotrichum gloeosporioides* foi inoculado neste meio enriquecido em multicamada com nanoemulsão de dispersão uniforme; no filme em monocamada com óleo de erva doce disperso sem nanoemulsão; e no controle. Primeiramente foi preparado o meio de cultura (BDA), o qual foi dissolvido em água destilada e esterilizado a 121°C (a); logo em seguida foi retirado da autoclave e em temperatura de 80°C foi adicionado amido de fruta pão e alginato gelatinizado a 70°C (b) em meio de cultura líquido e realizada a homogeneização pela mistura manual até a dissolução destes por completo (c). Resfriou-se o meio até 40°C, sendo adicionado ao mesmo a solução de quitosana (elaborada com quitosana dissolvida em solução de ácido acético a 1%), Tween 40[®] e do óleo essencial de erva doce disperso como nanoemulsão de dispersão uniforme (d) que foi realizada por mistura manual, até total homogeneização do meio (e). Após o meio está enriquecido, foi adicionado 15mL em placas de Petri de 9cm em câmara de fluxo asséptico laminar e até a total solidificação do meio (f). O inóculo de 4mm foi disposto no centro da placa de Petri (g)

e a incubação do meio realizou-se em condição ambiente 23 ± 2 °C e 80 ± 4 % UR por nove dias consecutivos (h).

[029] Para obtenção deste processo de controle do *Colletotrichum gloeosporioides*, foram realizados pré-ensaios, nos quais foram testadas 13 formulações, incluindo o controle absoluto e os filmes em monocamadas. Os testes foram aplicados inicialmente na elaboração do meio de cultura, os ingredientes das multicamadas, nas formulações com variações de percentuais de óleo essencial de erva doce, quitosana, amido de fruta pão, glicerol e Tween 40[®], de modo a ser obter inicialmente as formulações mais eficientes no que se refere ao controle do desenvolvimento do fitopatógeno, as quais foram avaliadas através de análise superfície de resposta.

[030] Estas 13 formulações elaboradas foram avaliadas em quatro repetições, inclusive nos experimentos envolvendo frutos. Para validação dos melhores resultados o experimento foi repetido seis experimentos em períodos diferentes, para assegurar a seleção da melhor formulação para aplicação nos frutos. Na **Figuras 3** os percentuais de inibição do *Colletotrichum gloeosporioides* (**Figura 3A**) e número de esporos (**Figura 3B**) variaram de acordo com o tipo de formulação, evidenciando a efetividade da formulação com base no processo e forma de aplicação. As formulações que apresentam tais características foram as **Formulação 1**: utilizada como controle absoluto, na qual era composta apenas de suspensão de amido, preparada a 90°C, sem adição de nenhum ingrediente (antifúngico) da formulação das multicamadas, apenas o meio de cultura BDA o que foi fundamental para proliferação do fungo na placa de Petri. A **Formulação 2** consistiu em recobrimento em monocamada formada por polissacarídeo, plastificante, surfactante o ingrediente antifúngico óleo de erva doce por dispersão normal, o qual, mesmo com a presença em sua composição de óleo de erva doce, que resultou em queima do fruto e ineficácia na inibição do desenvolvimento do fungo, bem como, sua produção de esporos, além da quitosana.

[031] Na **Formulação 3** consistia em filme elaborado em multicamada formada por primeira camada recobrimento, formado por amido de fruta pão gelatinizado, solução de quitosana e glicerol, a segunda camada do recobrimento foi composta por

alginate gelatinizado, óleo essencial e erva doce, Tween 40[®] e glicerol para formar a nanoemulsão a qual foi eficiente quanto ao percentual de inibição de crescimento e redução do número de esporos produzidos do *C. gloeosporioides*. Notou-se que a formulação elaborada por multicamadas foi claramente mais eficiente.

[032] Quanto aos parâmetros de inibição do desenvolvimento e produção de esporos do *C. gloeosporioides*, além de agir como envoltório protetor do fruto; evitando assim, danos provocados pela ação do contato direto com o ingrediente ativo, bem como, danos provocados por interação das substâncias presentes no óleo essencial, que em mínimas quantidades podem causar queimaduras na casca dos frutos, tornando-os inadequados à comercialização e ao consumo humano, sendo, consequentemente, descartados. Portanto, destas três formulações, a representada pela multicamada (**Formulação 3**) apresentou significativo efeito antifúngico e de redução da taxa metabólica, e a opção desta formulação para patenteamento foi baseada nos efeitos independentes das camadas, mas ao mesmo tempo sinérgica dos constituintes presentes nas multicamadas na manutenção da qualidade e sanidade de frutos pós colheita.

[033] Os frutos foram submersos em formulações, as quais foram inicialmente aplicadas para controle antifúngico *Colletotrichum gloeosporioides*, após a avaliação microbiológica destas, as mesmas foram aplicadas em frutos, a fim de avaliar os parâmetros relacionados aos níveis de ácido ascórbico e sólidos solúveis aos doze (12) dias de armazenamento sob a condição ambiente (24 ± 2 °C e 72 ± 4 % UR). As formulações foram baseadas na composição da primeira e segunda camadas. Para fim comparativo, frutos foram avaliados sem a presença das multicamadas, o controle, denominado como **Formulação 1**; os demais foram denominados **Formulação 2**, o recobrimento em monocamada e **Formulação 3**, recobrimento em multicamadas. Estas formulações são compostas por concentrações de antimicrobianos associados com concentrações fixas de polissacarídeos, surfactante e plastificante, a fim de formar recobrimentos a base de mono e multicamadas biodegradáveis que provoquem retardo na maturação de frutos sem provocar perdas na composição básica.

[034] Evidencia-se que as formulações (**Figura 5**) apresentaram comportamentos distintos com relação à atividade respiratória dos frutos, com implicação direta na manutenção dos teores de ácido ascórbico e sólidos solúveis nos frutos (**Figura 5**). A **Formulação 1** (controle absoluto), apresentou elevada taxa respiratória e, conseqüentemente, maiores níveis de ácido ascórbico e sólidos solúveis aos 12 dias de armazenamento, como indicativo do avanço da maturação; de forma similar, mas em menor extensão, frutos recobertos com a **Formulação 2** (monocamada), apresentaram diferenças nos conteúdos destes constituintes, mas sem o impacto da Formulação 3. A **Formulação 3**, apresentou taxa respiratória menor e níveis de ácido ascórbico e sólidos solúveis bem abaixo das demais formulações, indicando retardo do amadurecimento.

[035] Denota que a presença da multicamada mais uma vez foi efetiva na redução da taxa metabólica, resultando em retardamento da maturação do fruto, sem comprometer o potencial funcional. Esta tecnologia de multicamada visa manter níveis de sólidos solúveis e ácido ascórbico durante o armazenamento de frutos, que ao atingirem os domicílios dos consumidores poderão evoluir na maturação, atingindo a máxima qualidade comestível e funcional. Além disso, o uso de multicamadas também evidencia a proteção do fruto contra agentes fitopatogênicos, que irão ocasionar podridão e aceleração do processo de senescência, com conseqüentemente perdas econômicas (por não aceitabilidade do consumidor a frutos que não apresentam qualidade para o consumo), nutricionais e funcionais.

[036] Este processo consiste na formulação de recobrimentos biodegradáveis em multicamadas que possam agir diretamente no controle da maturação e na inibição do desenvolvimento de fitopatógenos em frutos tropicais, sem comprometimento da integridade, qualidade e aceitação, garantindo que consumidor tenha acesso à alimentos seguros e com elevado padrão de qualidade nutritiva e funcional. Para isso as formulações foram elaboradas da seguinte forma: **Formulação 2 (monocamada)**: consiste no uso de camadas compostas por polissacarídeos, um agente antifúngico, surfactante e plastificante; em proporções distintas para cada tipo de ingrediente, diferente da de **Formulação 3 (multicamada)**, consiste no uso de

polissacarídeos, e dois antimicrobianos, surfactantes e plastificantes, no entanto, em concentrações distintas para os dois de antifúngicos.

[037] Ambas camadas da formulação 3 com concentrações distintas de antifúngicos e concentrações fixas de polissacarídeos, surfactantes e plastificantes, agiram de forma sinérgica na ação contra o desenvolvimento do *Colletotrichum gloeosporioides* e sua produção de esporos, bem como, agiram também de forma sinérgica com os demais componentes fixos das multicamadas no retardo da maturação dos frutos, reduzindo a taxa respiratória (TR), mantendo os teores de sólidos solúveis (SS) e ácido ascórbico (AA) durante o armazenamento.

[038] Este recobrimento permitirá que o fruto atinja a casa do consumidor ainda avançando na maturação, e, neste estágio aumentar os teores SS e de AA. Assim, este processo de obtenção e o produto (recobrimento em multicamadas), torna-se um aliado na manutenção da qualidade de fruto pós-colheita, garantindo a evolução da maturação na casa do consumidor. Na **Figura 5A (ácido ascórbico) e 5B (sólidos solúveis)**, pode-se verificar os teores de SS e AA e nota-se que os recobrimentos foram efetivos na sua manutenção. De acordo com INTERNATIONAL LIFE SCIENCES INSTITUTE DO BRASIL (ILSI BRASIL, 2012) os teores de ácido ascórbico em frutos são considerados nutricionalmente significativos quando superiores de 70mg/100g.

REIVINDICAÇÕES

1. **“Processo e produto em multicamadas biodegradáveis com ação funcional na conservação da qualidade pós colheita de frutos” caracterizado por** processo para produzir produto com ação efetiva na manutenção da qualidade pós colheita de frutos, prevenindo desordens fisiológicas geralmente ocasionadas pelo contato direto dos ingredientes ativos ao fruto.
2. **“Processo e produto em multicamadas biodegradáveis com ação funcional na conservação da qualidade pós colheita de frutos”,** de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** referido produto possibilitar a redução da taxa respiratória, manter os conteúdos de sólidos solúveis e da vitamina C e inibir o desenvolvimento fúngico.
3. **“Processo e produto em multicamadas biodegradáveis com ação funcional na conservação da qualidade pós colheita de frutos”,** de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** uso do amido de fruta pão e solução de quitosana e glicerol para formação da primeira camada.
4. **“Processo e produto em multicamadas biodegradáveis com ação funcional na conservação da qualidade pós colheita de frutos”,** de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** uso de óleo essencial de erva doce na forma de nanoemulsão uniformemente dispersa e alginato para formação da segunda camada.
5. **“Processo e produto em multicamadas biodegradáveis com ação funcional na conservação da qualidade pós colheita de frutos”,** de acordo com as reivindicações 1 e 4, **caracterizado pela** produção de nanoemulsão à base de óleo essencial de erva doce, glicerol e Tween 40[®] uniformemente dispersos na matriz de alginato.
6. **“Processo e produto em multicamadas biodegradáveis com ação funcional na conservação da qualidade pós colheita de frutos”,** de acordo com as

reivindicações 1 e 3, **caracterizado pelo** preparo da primeira camada por meio do pré processamento em Ultra Turrax por 3 minutos consecutivos do amido obtido de fruta pão, após levado ao aquecimento até gelatinização a 90°C com água destilada(A), em seguida arrefecido até a temperatura de 60°C e adicionado 0,5% de glicerol como plastificante e solução de quitosana(B), logo em seguida realizada homogeneização manual de toda a mistura(C), posteriormente feito novo arrefecimento de 24°C para só então fazer a aplicação nos frutos por meio de imersão(D).

7. **“Processo e produto em multicamadas biodegradáveis com ação funcional na conservação da qualidade pós colheita de frutos”**, de acordo com as reivindicações 1, 4 e 5, **caracterizado pela** elaboração de solução composta de água destilada acrescida de 0,5% de alginato gelatinizado a 70°C(F) e arrefecido a 60°C para adição de 0,5% de glicerol e Tween 40[®](G) e, em seguida, homogeneização manual(H).
8. **“Processo e produto em multicamadas biodegradáveis com ação funcional na conservação da qualidade pós colheita de frutos”**, de acordo com as reivindicações 1, 4, 5 e 7, **caracterizado pela** solução ser arrefecida até a temperatura de 40°C e 30% dela foi reservada à parte para a introdução e adição, gota a gota e com auxílio de dispersor/homogeneizador Ultra Turrax (**Figura 4**) por 3 minutos consecutivos, de óleo essencial de erva doce.
9. **“Processo e produto em multicamadas biodegradáveis com ação funcional na conservação da qualidade pós colheita de frutos”**, de acordo com as reivindicações 1, 4, 5, 7 e 8, **caracterizado por** a solução acrescida de óleo essencial de erva doce ser levada para ultrassom por 5 minutos consecutivos para redução das partículas ao nível de nanopartículas(I) e, logo em seguida, a emulsão ser arrefecida a 24°C para aplicação nos frutos.

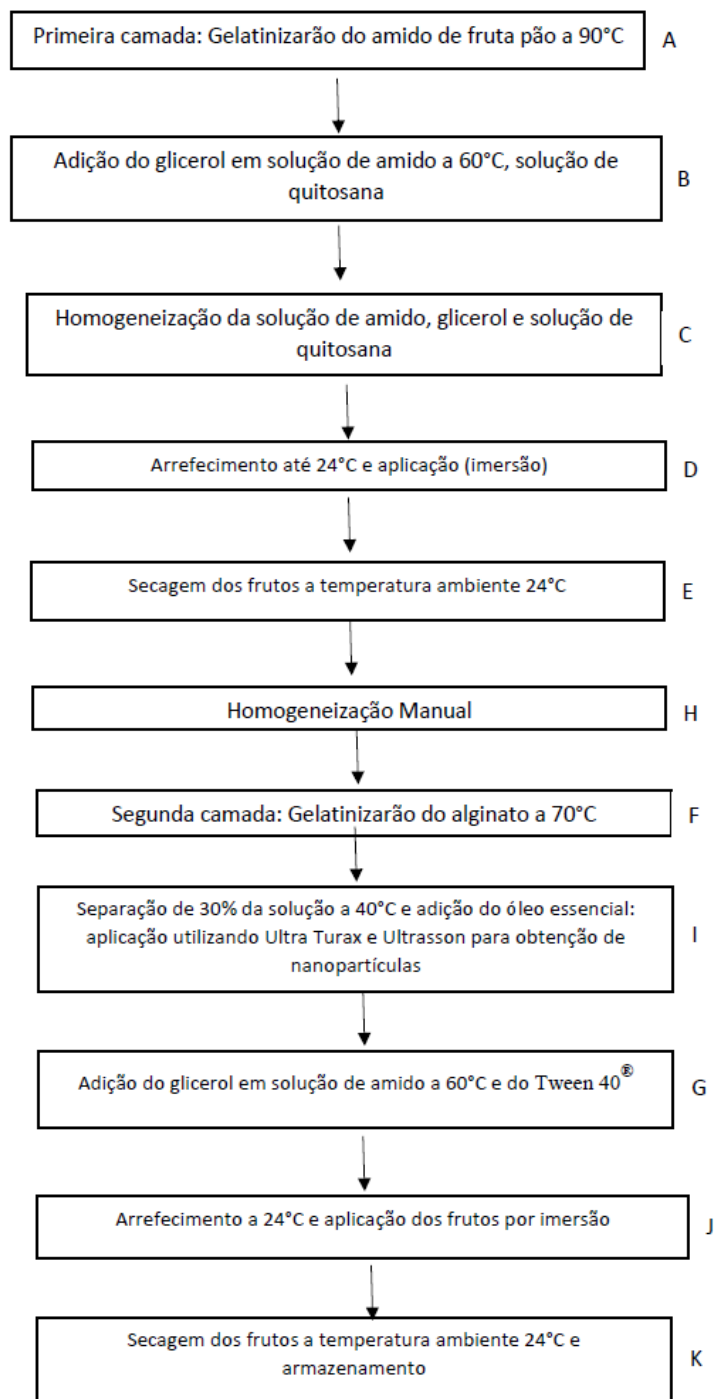


Figura 1

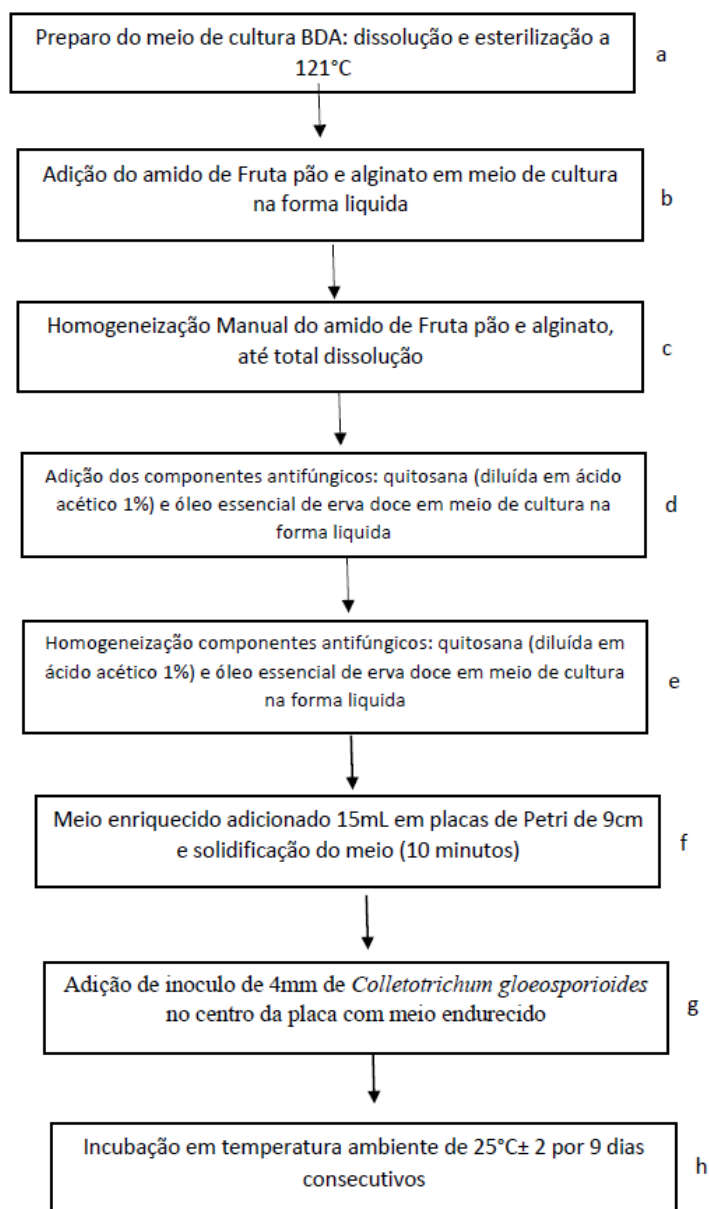
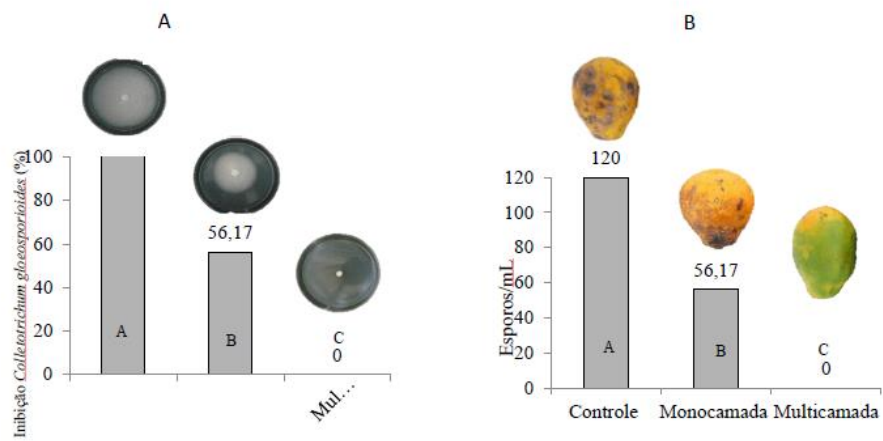


Figura 2



Figuras 3

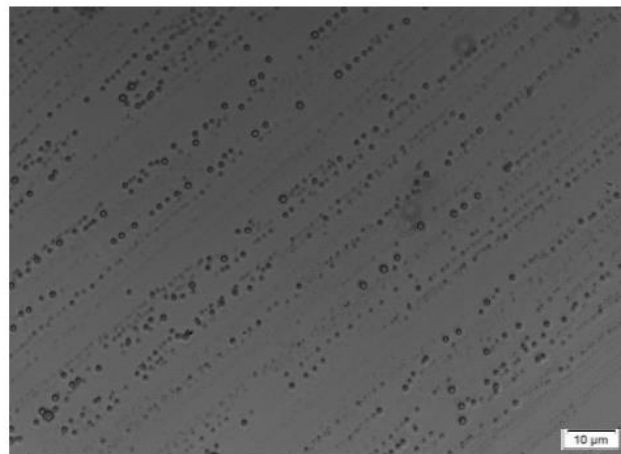


Figura 4

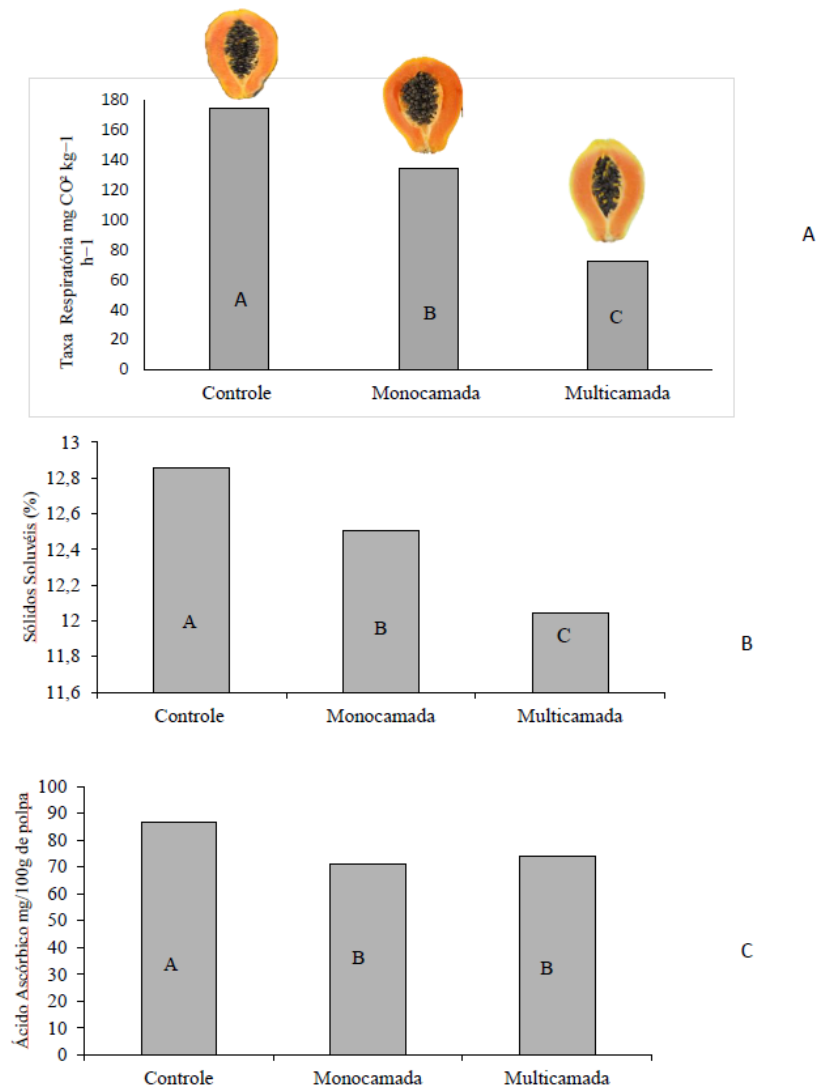


Figura 5

RESUMO**“PROCESSO E PRODUTO EM MULTICAMADAS BIODEGRADÁVEIS COM AÇÃO FUNCIONAL NA CONSERVAÇÃO DA QUALIDADE PÓS COLHEITA DE FRUTOS”**

A presente invenção refere-se ao produto e processo para obtenção de recobrimentos em multicamadas biodegradáveis, compostas por, na primeira camada, amido de fruta pão (*Artocarpus altilis*) e quitosana, e na segunda camada por alginato, óleo essencial de erva doce na forma de nanoemulsão e Tween 40[®], sendo incorporado em ambas as camadas glicerol. Este produto tem a função de manter a qualidade e a sanidade pós-colheita de frutos tropicais. A combinação destes constituintes em multicamadas torna o recobrimento eficaz em reduzir a taxa metabólica e minimizar o desenvolvimento de fitopatogênicos que consistem na principal causa das elevadas perdas pós-colheita de frutos e hortaliças e de enormes prejuízos para a produção agrícola. A aplicação deste processo e produto é uma alternativa ecologicamente correta, viável economicamente, uma vez que as matérias primas são amplamente disponíveis na natureza, tecnologicamente limpa e sustentável, além de ser de fácil aplicação em frutos, sendo também eficiente na redução da taxa metabólica e o controle de doenças pós colheita causadas pela ação de micro-organismos fitopatogênicos de ampla ocorrência em frutos e hortaliças.

Breadfruit Starch and Chitosan with Essential Oil Nanoemulsion Enhances ‘Golden’ Papaya Postharvest Life

Amido de Fruta-Pão e Quitosana com Nanoemulsão de Óleo Essencial Aumenta a Vida Pós-colheita de Mamão ‘Golden’

ABSTRACT - The objective of this work was to evaluate the effect of bilayer coating on the metabolism, quality and sensorial attributes of ‘Golden’ papaya at room storage. For the bilayer, the upper layer contained a fixed 0.5% sodium alginate content with different levels of essential oil (EO), as nanoemulsion, which was assembled on the lower layer that contained fixed content of 2.0% breadfruit starch combined with different levels of chitosan (C). From that, it was formulated the following bilayer: (0.43EO + 0.85C), (0.50 EO + 0.50C), (0.25 EO + 0.50C), (0.25 EO + 0.00C), and control (fruits without coating). The experimental design was the completely randomized, with 5 treatments and 4 replications. Fruits were stored room condition (24±2°C e 75% UR) for 12 days. The application of the bilayer (0.50 EO + 0.50C) was effective in delaying the papaya climacteric peak, reducing the mass losses, and keeping lower soluble solids and titratable acidity contents, clearly delaying fruit ripening. For the intensities of flavor, odor and sweet taste, purchase intention and the overall acceptance, papaya with this bilayer received higher scores at the 12th day, and no limiting damage was reported. Together, the use of breadfruit starch as a matrix and the bilayer (0.50 EO + 0.50C) was effective in reducing the metabolic rate, maintaining the quality and enhance the useful postharvest life of Golden ‘papaya’ for at least 12 days at room conditions.

Key Words: *Artocarpus altilis*. *Foeniculum vulgare*. Coating. Nanotechnology. Bilayer

RESUMO O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de recobrimento em bicamadas no metabolismo, qualidade e atributos sensoriais de mamão cv. Golden no armazenamento ao ambiente. Nas bicamadas, a camada superior continha teor fixo de alginato de sódio (0.5%) como matriz e diferentes teores de óleo essencial (EO) de erva doce, incorporado como nanoemulsão, que foi sobreposta na camada inferior, com teor fixo de amido de fruta pão (2.0%) como matriz e diferentes teores de quitosana (C). Assim, as camadas (superior + inferior) apresentavam os seguintes %: (0.43EO + 0.85C); (0.50 EO + 0.50C); (0.25 EO + 0.50C); (0.25 EO + 0.00C) e controle (mamões sem recobrimento). O armazenamento foi realizado na condição ambiente (24±2°C e 75% UR) durante 12 dias. O delineamento foi o inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 4 repetições. A aplicação da bicamada (0.50 EO + 0.50C) foi efetiva em retardar o pico climatérico, reduzir a perda de massa, os sólidos solúveis e acidez titulável, notadamente retardando o amadurecimento dos frutos. Nos atributos intensidades de sabor, odor e sabor doce, intenção de compra e aceitação global, mamão com esta bicamada recebeu notas mais elevadas no 12º dia e também não foi reportado presença de danos limitantes. Em conjunto, a utilização de amido de fruta pão como matriz e a bicamada (0.50 EO + 0.50C) foi claramente efetiva em reduzir a taxa metabólica, manter a qualidade e aumentar a vida útil pós-colheita de mamão ‘Golden’ por pelo menos 12 dias de armazenamento ao ambiente.

Palavras – chaves: *Artocarpus altilis*. Recobrimento. *Foeniculum vulgare*. Nanotecnologia. Bicamada

INTRODUÇÃO

O mamoeiro é uma das mais importantes frutíferas comerciais do Brasil suprindo o mercado interno e de exportação (PASSOS *et al.*, 2016). Entretanto, o mamão é um fruto climatérico que apresenta intenso metabolismo e altas taxas respiratória (PAREEK, 2016) com

consequente rápido amadurecimento e elevadas perdas pós-colheita (ALI *et al.*, 2010), necessitando de tecnologias limpas para manutenção da qualidade. O desenvolvimento de recobrimentos biodegradáveis baseados em fontes renováveis de amidos vem agregando inovações da nanotecnologia, buscando alternativas sustentáveis aos polímeros sintéticos, com foco em prolongar a vida útil pós colheita de frutos e hortaliças frescos (KALIA; PARSHAD, 2014). A incorporação de nanopartículas num recobrimento pode tornar mais eficiente a sua ação como barreira protetora (XIN *et al.*, 2017), reduzindo as taxas metabólicas, de modo a reduzir a taxa respiratória e transpiração, retardando a senescência (GARDESH *et al.*, 2016).

Amidos ricos em amilose têm sido utilizados desenvolvimento de recobrimentos devido ao seu potencial para formar matriz continua, baixa permeabilidade ao vapor de água e baixo custo (VERSINO *et al.*, 2016). Neste sentido, a fruta pão (*Artocarpus altilis*) caracteriza-se como fonte promissora de amido com elevado teor de amilose, ainda não explorada (NWOKOCHA; WILLIAMS, 2011). A quitosana tem sido utilizada na elaboração de recobrimentos por suas propriedades de melhorar as características físicas, ser atóxico, apresentar baixa permeabilidade ao O₂, biocompatibilidade com outras matérias primas (GARDESH *et al.*, 2016). Entretanto, teores de quitosana superiores a 2% comprometeram o amadurecimento de mamão (ALI *et al.*, 2010). A associação de amidos de diferentes fontes à quitosana em concentrações mais baixas têm se mostrado mais efetivo em retardar o amadurecimento, mantendo a qualidade e aceitação sensorial de manga com óleo essencial de erva doce (AZEREDO *et al.*, 2016) e goiaba ‘Paluma’ (RODRIGUES *et al.*, 2018).

O óleo essencial de erva doce tem efeito antioxidante, além de ser benéfico na proteção de plantas como inseticida, fungicida e bactericida natural (PAVELA *et al.*, 2016). No entanto, a aplicação direta de óleos essenciais nos frutos pode provocar desordens fisiológicas. O uso de multicamadas é uma abordagem baseada na deposição alternativa de recobrimentos, com propriedades polieletrólitos de cargas opostas (BRASIL *et al.*, 2012; MARTINON *et al.*, 2014). Geralmente, as camadas são sequencialmente adicionadas aos frutos visando a união física e química, através da imersão em soluções filmogênicas distintas (SIPAHI *et al.*, 2013), que pode evitar o contato direto do óleo essencial com o fruto e otimizar sua liberação, se aplicado como

nanoemulsão em camadas mais externas (KALIA; PARSHAD, 2014). As propriedades físicas das nanoemulsões de óleos essenciais são mais estáveis (SEVERINO *et al.*, 2015) e em relação as emulsões convencionais, as nanoemulsões elaboradas com uso de alta energia, quando aplicadas em filmes, apresentam maior atividade funcional (CARVALHO *et al.*, 2016) e melhora a permeabilidade aos gases (CHEN *et al.*, 2016).

Não existem estudos sobre uso de bicamadas, compostas por nanoemulsão de óleo essencial de erva doce em alginato, e amido de fruta pão como matriz com quitosana em mamão. Com isso, o objetivo deste trabalho, foi avaliar a influência da aplicação dessa bicamada no metabolismo, qualidade e aceitação sensorial de mamão ‘Golden’.

MATERIAL E MÉTODOS

Mamões Solo cv. Golden (*Carica papaya*. L.) foram colhidos de plantio comercial, conduzido sob práticas usuais de manejo cultural, do município de Mamanguape-PB, no estágio de maturação 2 (25% de coloração amarela e 75% de coloração verde). Após a colheita os frutos foram transportados ao laboratório em caixas isotérmicas, protegidas com papel bolha. No laboratório foram lavados com água potável e sanitizados com hipoclorito de sódio a 200ppm durante 15 min e dispostos em bancada sanitizada para secagem ao ar. Para o desenvolvimento dos recobrimentos em bicamadas foi utilizado amido de fruta pão, quitosana (Polymar), alginato de sódio (Dinâmica), óleo de erva doce (*Foeniculum vulgare Dulce*) (Ferquima), tensoativo (Twenn 40[®]) e glicerol (Dinâmica), todos de grau alimentício.

O amido de fruta pão (*Artocarpus altilis*) foi preparado após a colheita do fruto maduro, sanitização com hipoclorito de sódio a 200ppm e secagem ao ar. A fruta foi descascada, a polpa cortada em pedaços e submetida a três triturações em liquidificador industrial com água bidestilada. A massa obtida foi prensada e a suspensão foi decantada por 12 horas (SCHOCH; MAYWALD, 2001). A secagem foi realizada em liofilizador (Terrone Mod. LD 1500) por 36 horas a -54°C. Ao final, o amido apresentava umidade residual de 17,2%.

O detalhamento da preparação das formulações dos recobrimentos em bicamadas deste trabalho está amparado pela Patente nº. BR102017022068-0, protocolo nº.

870170078008. As concentrações das bicamadas foram definidas em experimentos prévios, a partir da utilização de matriz composto central de box. Na camada superior, foi elaborado solução com concentração fixa 0.5% de alginato de sódio (A) em água bidestilada, gelatinizado a 70 °C, sendo adicionado sob agitação 0.25% de glicerol e 0.50% de Tween 40[®]. Nesta solução de A, foi incorporada individualmente concentrações de 0.25%, 0.25%, 0.43% e 0.50% de óleo essencial (EO) de erva doce como nanoemulsão, obtida pelo uso sequencial de Ultraturax e Ultrasom, compondo a camada superior. Para a camada inferior, foi preparada solução com concentração fixa de amido (2.0%) de fruta pão (S) em água bidestilada, gelatinizado a 90°C sob agitação com Ultraturax. Nesta solução de S foi incorporada individualmente concentrações de quitosana (C) (diluída com ácido acético a 1%) de 0.0%, 0.25%, 0.25% e 0.85% e em cada 0.25% de glicerol, compondo a segunda camada. Portanto, o delineamento foi o inteiramente casualizado, formado por 4 formulações de bicamadas, com concentrações fixas de A e S (0.5%A (camada superior) + 2%S (camada inferior)) contendo nas camadas: 0.43EO + 0.85C; 0.50 EO + 0.50C; 0.25 EO + 0.50C e 0.25 EO + 0.00C, mais o controle (mamões sem recobrimentos), num total de 5 tratamentos, em 4 repetições de 1 fruto.

As bicamadas foram aplicadas por imersão, sendo a camada inferior (amido com quitosana) por 60 seg e seca ao ambiente. Em seguida, os mamões com a camada inferior seca foram imersos na solução da camada superior (alginato com nanoemulsão de óleo essencial) e colocados a secar. Frutos com bicamadas e os do controle foram separados em 4 repetições (um fruto/por repetição) em bandejas de poliestireno expandido e mantidos na condição ambiente (24±2.0°C e 74 ± 2% RH) durante 12 dias, sendo avaliados a cada 02 dias.

Os frutos foram avaliados quanto à perda de massa, pela pesagem diária em balança semianalítica, pela diferença percentual em relação ao peso inicial; Firmeza (N) do fruto íntegro, com penetrômetro manual Magness Taylor Pressure Tester, com duas leituras na região equatorial em lados opostos do fruto; Índice de cor (IC) da casca, calculado a partir dos valores de L , a^* e b^* , da cor da casca com colorímetro (Konica Minolta) conforme equação $IC=2000*(a^*)/L^*(\sqrt{((a^*)^2+(b^*)^2)})$ (RODRIGUES *et al.*, 2018); Sólidos solúveis (SS), com refratômetro de bancada tipo Abbe a 20 °C; acidez titulável (AT- g ácido cítrico.100 g⁻¹ de polpa), por titulometria com solução de NaOH 0,1 M; relação SS/AT, pela divisão dos SS por AT (AZEREDO *et al.*, 2016). O tempo para atingir o pico climatérico e a atividade respiratória no pico foi monitorado 24 horas após a aplicação das bicamadas e nos frutos do controle na condição ambiente (24 ± 2°C) em quatro repetições (≅1000g/repetição) em jarras herméticas de 3000 mL durante 12 dias. As amostras foram continuamente ventiladas com suprimento de ar desumidificado e isento de CO₂, com vazão de 10 mL.min⁻¹. O sistema era fechado por uma hora para a coleta das amostras de CO₂ com seringa e 1 mL era injetado em analisador de CO₂ (CA-10, Sable Systems-EUA) acoplado à integrador. A produção de CO₂ (mL CO₂ .kg⁻¹.h⁻¹) foi obtida comparando o padrão de 2,5% de CO₂ (RODRIGUES *et al.*, 2018).

Este trabalho está amparado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPB, sob o nº CAAE: 45784315.9.0000.5188. Para a análise sensorial, foram selecionados e treinados 24 painelistas com base na percepção de doçura, odor e sabor característico, com idade média de 32 anos, compostos por homens e mulheres consumidores de mamão. O julgamento, em cabines individuais, dos atributos intensidade de sabor e odor característicos e de sabor doce em amostras codificadas de polpa (6 amostras/tratamento) foi realizado através de fichas com escala de 9 pontos (extremamente fraco a extremamente forte). Para os danos limitantes em frutos íntegros (Ausente a Muito forte), com notas limites 2, e intenção de compra (Não compraria a

certamente Compraria) e aceitação global (Desgostei muitíssimo a Gostei muitíssimo), com nota limites 4, numa escala de 9 pontos (MEILGAARD et al., 2006).

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p \leq 0,05$). Para períodos (dias) aplicou-se análise de regressão polinomial até 2º. grau e para as bicamadas o teste Tukey ($p \leq 0,05$). Realizou-se análise de componentes principais, sendo consideradas como significativas aquelas variáveis acima do limite de inclusão (resultado da multiplicação do maior auto vetor por 0,7), utilizando o software SAS® 9.3 (2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de bicamada em mamão ‘Golden’ foi eficiente em retardar pico climatérico e reduzir a produção de CO₂ ($\approx 32\%$) em relação aos frutos do controle (Tabela 1). Mais notadamente, mamões com bicamada com 0.5% de nanaemulsão de óleo essencial (EO) na camada superior e 0.5% de quitosana (C) na superior (0.50 EO + 0.50C), destacaram-se em retardar em mais de 8 dias a ascendência climatérica, de modo que aos 12 dias o pico climatérico ainda não havia sido atingido. Isto é um indicativo de que estas concentrações de óleos essencial na camada superior e a de quitosana na inferior atuaram sinergisticamente em reduzir a taxa metabólica mamão. A ausência de quitosana na bicamada (0.25 EO + 0.00C) resultou em aumento e antecipação do climatério, indicando ser esta necessária para estruturar a camada inferior. Goiabas ‘Paluma’ recobertas com 2% de amido de semente de jaca com quitosana também apresentaram retardo no climatério no armazenamento ao ambiente (RODRIGUES et al., 2018), como também em cerejas recobertas com nanoquitosana (XIN et al., 2017).

Table 1. Tempo para atingir o pico climatérico e produção de CO₂ sob a condição ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$ e $74 \pm 2\%$ RH) de mamão ‘Golden’ recoberto com bicamada. A camada superior com teor fixo de alginato de sódio (0.5%) como matriz e diferentes teores de óleo essencial (EO) de erva doce incorporado como nanoemulsulsão, que foi, sequencialmente, depositada na camada inferior, com teor fixo de amido de fruta pão (2.0%) como matriz e diferentes teores de quitosana (C), com % nas camadas (superior + inferior): (0.43EO + 0.85C); (0.50 EO + 0.50C); (0.25 EO + 0.50C); (0.25 EO + 0.00C) e controle (mamões sem recobrimento)

Coating layer (Upper + Lower) *(0.5A + 2S)	Days to reach the climacteric peak postharvest	CO ₂ Production at the climacteric peak (mg CO ₂ .Kg ⁻¹ .h ⁻¹)
**Control	4	54.23±0.33a
0.43EO + 0.85C	8	36.48±0.30d
0.50 EO + 0.50C	12***	-
0.25 EO + 0.50C	7	37.54±0.41c
0.25 EO + 0.00C	6	39.25±0.51b

*Fixed concentrations of 0.5% sodium alginate (A) and 2.0% breadfruit starch (S);** Control = fruits without coating; ***Fruits still did not reach the climacteric peak; n=4.

Em manga ‘Tommy Atkins’ a aplicação de multicamadas de 3% quitosana e pectina melhorou as propriedades de barreira (MEDEIROS *et al.*, 2012). Entretanto, neste trabalho, mamões com a bicamada (0.43EO + 0.85C) apresentaram pico climatérico após 8 dias, indicando que a maior concentração de quitosana adicionada à matriz de amido de fruta pão pode ter proporcionado maior permeabilidade desta bicamada a O₂.

A perda de massa de mamão com bicamada foi claramente reduzida com relação aos frutos do controle. Aos 12 dias, todos os frutos com bicamadas apresentaram perdas de massa inferiores a 11% (Figura 1A), enquanto que os do controle apresentavam 17.74%. A bicamada combinando a nanoemulsão de óleo essencial (EO) de erva doce e quitosana (C), a menor perda de massa foi de frutos da bicamada (0.50 EO + 0.50C), que apresentou 5,74% (≈32% menor que o controle), aceitável no armazenamento ao ambiente (PAREEK, 2016) comprovando a a eficiência desta bicamada em reduzir a taxa metabólica. Frutos das bicamadas (0.43EO + 0.85C), (0.25 EO + 0.50C) e (0.25 EO + 0.00C) 8,6%, 9,42% e 10,5% de perda de massa, respectivamente, no 12º dia de armazenamento. A maior perda de massa os frutos controle aponta para a eficiência das bicamadas em gerar uma atmosfera modificada (BRASIL *et al.*, 2012) capaz de reduzir a taxa metabólica. Deve ser ressaltado, no entanto, que a 2ª maior perda de massa na formulação sem quitosana (0.25 EO + 0.00C) indica a influência deste carboidrato em reduzir a permeabilidade à vapor de água na formulação. A perda de massa foi também reduzida em recobrimento a base de quitosana e alginato em abacaxi ‘Perola’ (GUIMARÃES *et al.*, 2017), amido de semente de jaca e quitosana em goiaba ‘Paluma’ (RODRIGUES *et al.*, 2018) e fécula de mandioca com quitosana e óleo essencial de erva doce em manga ‘Tommy

Atkins' (AZEREDO *et al.*, 2016) e em 'Chinese' cereja (XIN *et al.*, 2017). Entretanto, melão minimamente processado (MP) recoberto com 2% quitosana contendo óleo essencial não apresentou redução na perda de massa aos 15 dias a 4 °C (CARVALHO *et al.*, (2016).

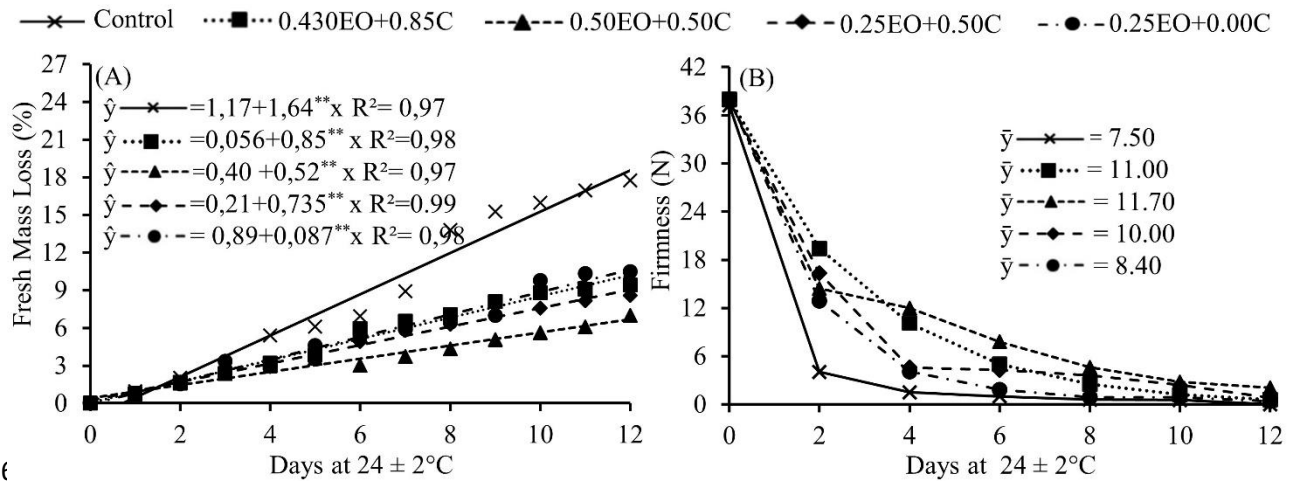


Figura 1. Perda de massa (A) e firmeza (B) em mamão 'Golden' recoberto com bicamada. A camada superior com teor fixo de alginato de sódio (0.5%) como matriz e diferentes teores de óleo essencial (EO) de erva doce incorporado como nanoemulsão, que foi, sequencialmente, depositada na camada inferior, com teor fixo de amido de fruta pão (2.0%) como matriz e diferentes teores de quitosana (C), com % nas camadas (superior + inferior): (0.43EO + 0.85C); (0.50 EO + 0.50C); (0.25 EO + 0.50C); (0.25 EO + 0.00C) e controle (mamões sem recobrimento), durante 12 dias na condição ambiente (24±2°C e 75% UR). n=4.

A firmeza do mamão do controle diminuiu 35N (≈ 89%) já no 2º dia diferindo ($p \leq 0,05\%$) dos demais frutos recobertos com bicamadas (Figura 1B). Mamões com bicamadas mantiveram a firmeza superior durante o armazenamento, sendo a firmeza média mais elevada (11,7N) nos com a bicamada (0.50 EO + 0.50C). Ausência da quitosana na camada inferior (0.25 EO + 0.00C) resultou em aumento do metabolismo dos frutos e, consequentemente, redução da firmeza. A perda de firmeza no mamão foi retardada pela presença das bicamadas, que proporcionou modificação da atmosfera interna do fruto, modificando a permeabilidade aos gases, retardando o amaciamento do fruto. Goiabas recobertas com amido de semente de jaca e quitosana mantiveram a firmeza mais elevada no armazenamento refrigerado e após a transferência para o ambiente (RODRIGUES *et al.*, 2018).

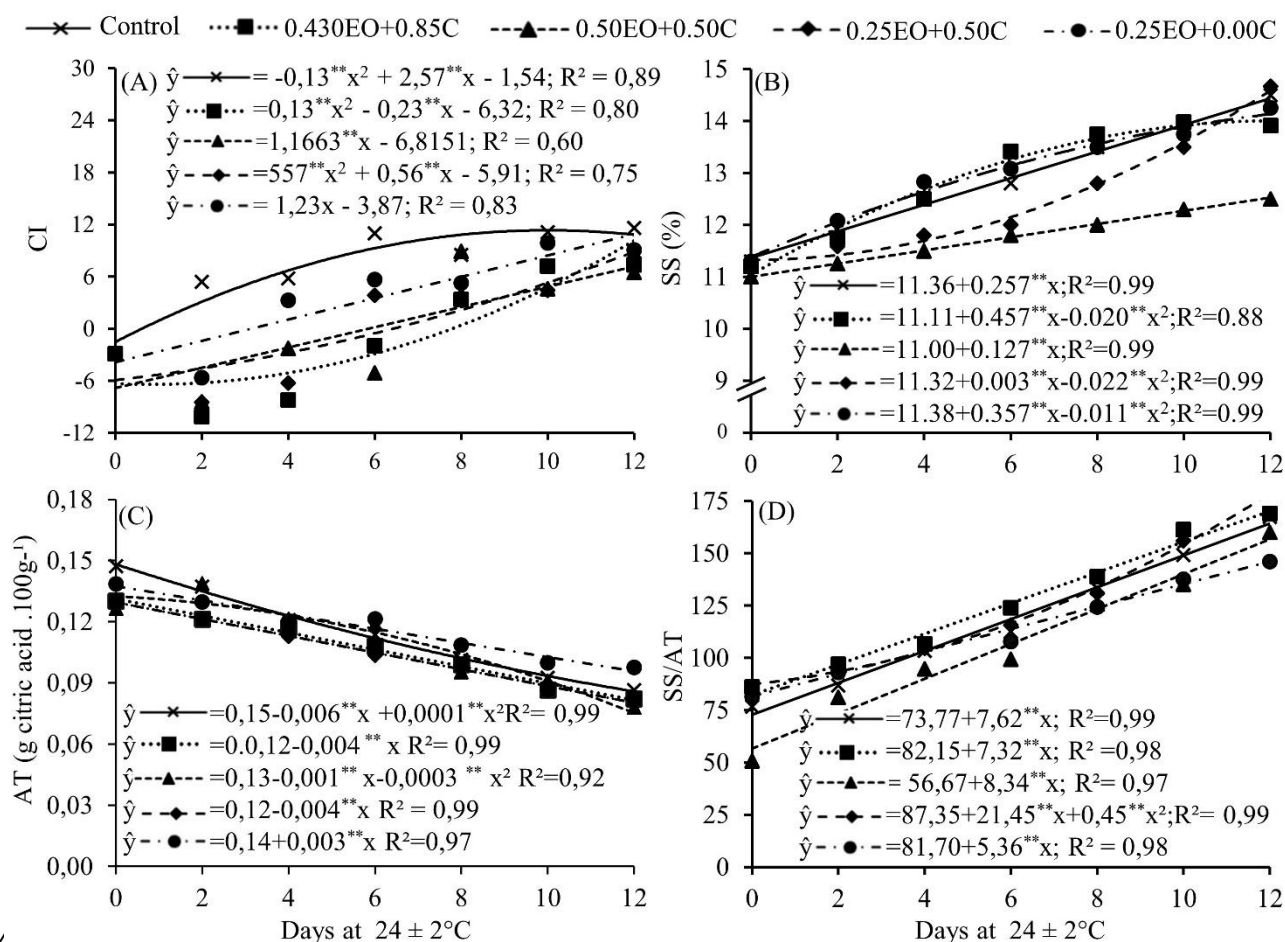


Figura 2. Índice de cor (A), sólidos solúveis (SS (B)), acidez titulável (AT(C)) e SS/AT (D) em mamão ‘Golden’ com bicamada. A camada superior com teor fixo de alginato de sódio (0.5%) como matriz e diferentes teores de óleo essencial (EO) de erva doce incorporado como nanoemulsão, que foi depositada na camada inferior, com teor fixo de amido de fruta pão (2.0%) como matriz e diferentes teores de quitosana (C), com % nas camadas (superior + inferior): (0.43EO + 0.85C), (0.50 EO + 0.50C), (0.25 EO + 0.50C), (0.25 EO + 0.00C), e controle (sem recobrimento), durante 12 dias na condição ambiente (24±2°C e 75% UR). n=4.

O índice de cor (IC) também mostrou um claro retardo no amadurecimento do mamão, sendo os com a bicamada (0.50 EO + 0.50C) os com evolução do IC mais lenta (Figura 2A), em contraste com os do controle cuja evolução da cor foi rápida, atingindo o máximo no 6º dia. Em mamão minimamente processado (MP) a aplicação de multicamadas retardou a evolução da coloração (BRASIL *et al.*, 2012). Melões Cantaloupe MP com multicamadas a base de óleos essenciais e quitosana também mostraram retardo na evolução da cor durante 15 dias a 4°C (MARTIÑON *et al.*, 2014). A evolução do IC também foi mais lenta em goiaba ‘Paluma’

recoberta com 2% amido de semente de jaca e 2% quitosana durante 16 dias a 12 °C (RODRIGUES *et al.*, 2018).

O teor de sólidos solúveis (SS) aumentou durante o armazenamento (Figura 2 B) mas foi mantido inferior em mamões com a bicamada (0.50 EO + 0.50C), atingindo 12.50% no 12º dia, enquanto o controle atingiu 14.6%, indicando que a aplicação desta bicamada reduziu a taxa de solubilização de polissacarídeos em açúcares solúveis, que resulta no aumento dos SS (PAREEK, 2016). Entretanto, a acidez titulável (AT) diminuiu durante o armazenamento (Figura 2C). O declínio no teor de AT é uma mudança decorrente do amadurecimento de mamão, que em geral é devida ao consumo de ácidos orgânicos no Ciclo de Krebs (PAREEK, 2016). O declínio da acidez titulável também foi reportado por Brasil *et al* (2012) em mamão MP recobertos com multicamadas durante 15 dias a 4 °C e em mangas recobertas com quitosana e óleo essencial de erva doce a 13 °C por 18 dias (AZEREDO *et al.*, 2016).

Devido aos baixos teores de AT e elevados de SS, os valores da relação SS/AT de mamão foram elevados e aumentaram durante o armazenamento (Figura 2 C). A relação SS/AT é um fator de qualidade importante nos frutos, sendo um indicativo do sabor doce. Portanto, quanto maior seu valor, maior é o grau de doçura, e consequentemente, maior aceitação pelo consumidor. Os valores médios da SS/AT diferiram entre frutos recobertos com bicamadas, com destaque para as bicamadas (0.43EO + 0.85C) e (0.25 EO + 0.50C), com valores de 126,13 e 123,87, respectivamente. Logo em seguida, estão os frutos controle com 118.50, e os frutos com bicamada sem quitosana (0.25 EO + 0.00C) com 113,86 e, por fim, os frutos com a bicamada de (0.50 EO + 0.50C), com 106,73. Este menor valor da SS/AT em mamões com esta bicamada é um indicativo do retardo na maturação, confirmando a eficiência desta na conservação pós-colheita dos frutos.

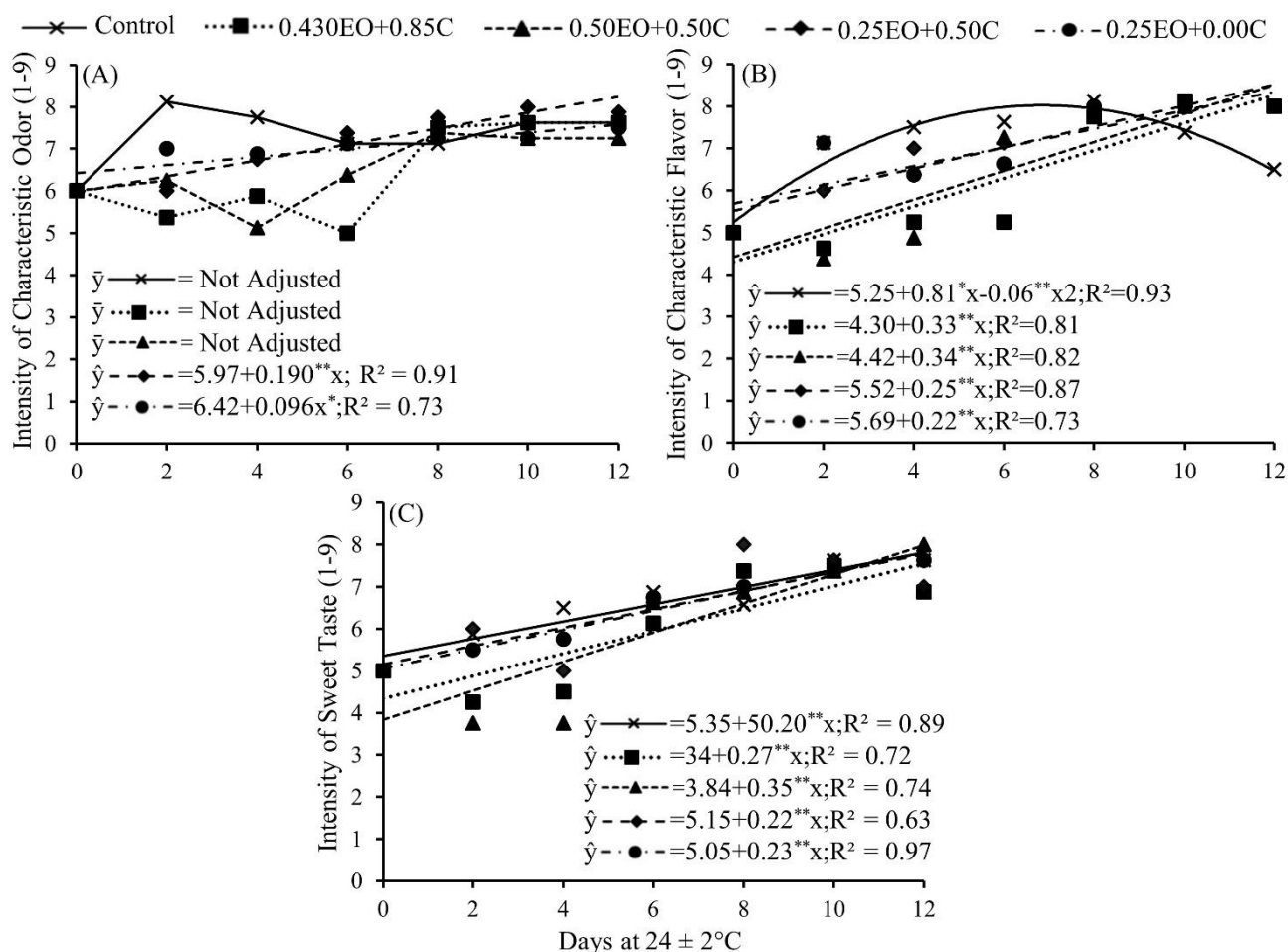


Figura 3. Intensidades de odor (A) e sabor característicos (B) e sabor doce (C) em mamão ‘Golden’ recoberto com bicamada. A camada superior com teor fixo de alginato de sódio (0.5%) como matriz e diferentes teores de óleo essencial (EO) de erva doce como nanoemulsão, e depositada na camada inferior, com teor fixo de amido de fruta pão (2.0%) como matriz e diferentes teores de quitosana (C), com % nas camadas (superior + inferior): (0.43EO + 0.85C), (0.50 EO + 0.50C), (0.25 EO + 0.50C), (0.25 EO + 0.00C), e controle (sem bicamada), por 12 dias na condição ambiente (24±2°C e 75% UR). n=4.

Em mamões com bicamada a percepção do odor característico foi avançando gradualmente no armazenamento (Figura 3A), notadamente naqueles com as bicamadas (0.50 EO + 0.50C) e (0.43EO + 0.85C), que, em média, não diferiram entre si. Por sua vez, já no 2º dia em frutos controle as notas para este atributo foram as mais elevadas (8,45) declinando em seguida, indicando claramente o impacto das bicamadas em retardar o amadurecimento. A nota de intensidade de odor dos frutos controle foi seguida pela a de mamão com bicamadas sem quitosana, indicando a contribuição desta na estruturação do recobrimento. No entanto, mamões

com bicamadas (0.43EO + 0.85C) e (0.50 EO + 0.50C) foram os que receberam menores notas neste atributo, que não deferiram entre si. Os frutos com as maiores notas nos atributos odor e sabor característicos (Figura 3 A e B) foram os com maturação avançada (controle), que a partir do 6º dia obtiveram declínio das notas. A rejeição dos painelistas pelos frutos do controle foi atribuída ao amadurecimento avançado e início da senescência.

A intensidade do sabor característico também evoluiu gradativamente até o 12º dia em mamões com as bicamadas, enquanto que nos do controle a percepção máxima foi atingida no 6º dia, seguido de rápido declínio (Figura 3B). A intensidade de sabor doce apresentou comportamento similar ao da intensidade de sabor, também indicando a evolução bem mais lenta para mamões com as bicamadas (0.43EO + 0.85C), (0.50 EO + 0.50C), nesta ordem (Figura 3C). Guimarães et al. (2017) utilizando alginato de sódio e amido de mandioca em abacaxi 'Perola' e Rodrigues et al. (2018) amido de jaca e quitosana em goiabas reportaram que estes não interferiram negativamente nos atributos de sabor doce, odor e sabor característicos, como também observado neste trabalho com alginato de sódio e nanomulsão de óleo essencial de erva doce em bicamada com amido de fruta pão e quitosana.

Em vagens, quitosna modificada contendo nanoemulsão de óleo essencial foi efetiva em manter a qualidade e segurança (SEVERINO et al., 2015). Óleo essencial de erva doce é um eficiente inibidor do desenvolvimento microbiano (PAVELA et al. 2016). Neste trabalho, o teor empregado de óleo essencial de erva doce na camada superior, que apresenta elevada atividade aromática, não foi percebido como negativo no recobrimento de mamão pelos painelistas. A aplicação de multicamadas manteve a qualidade sensorial no armazenamento refrigerado de mamão minimamente processado (MP), com multicamadas de pectina, quitosana e cloreto de cálcio (BRASIL *et al.*, 2012), melancia MP com alginato, pectina e lactato de cálcio (SIPAHİ *et al.*, 2013) e melão MP com multicamadas de quitosana, pectina e trans-cinamaldeído (MARTIÑON *et al.*, 2014). A aplicação de camadas sobrepostas tem efeito benéfico em não modificar os atributos sensoriais dos frutos, quando se utiliza óleos essenciais, contendo compostos aromáticos que conferem aromas intensos (CHEN *et al.*, 2016).

Mamões recobertos com bicamadas apresentaram menores níveis de danos limitantes ($p < 0,05$) que os do controle (Figura 4A), que já apresentavam danos severos a partir do 4º dia, caracterizado pela presença de manchas de antracnose (Figura 4A). Em mamões recobertos com (0.50 EO + 0.50C) não foram observados danos limitantes ocasionado por podridão no 12º dia (nota 1). Mamão recoberto com 1,5 e 2,0% quitosana teve a incidência de antracnose inibida (ALI *et al.*, 2010), entretanto 2% quitosana prejudicou o amadurecimento, que resultou na redução da intenção de compra pelos painelistas (Figura 3B). Neste sentido a combinação de 0.5 de óleo essencial de erva doce e 0.5% de quitosana a bicamada (0.50 EO + 0.50C) em mamão foi efetivo no controle de desenvolvimento de doenças e apresentar intenção de compra e aceitação global ascendentes durante 12 dias de armazenamento ao ambiente, indicando que o amadurecimento avançava lentamente, aumentando da vida útil pós-colheita.

Nano-quitosana reduziu a incidência de podridão e manteve os atributos sensoriais de Chinese cereja (XEN *et al.*, 2017) e maçã (GARDESH *et al.*, 2016) indicando a efetividade nas nanopartículas em modificar as propriedades dos recobrimentos (CHEN *et al.*, 2016). Neste trabalho, os níveis de quitosana utilizados foram muito baixos indicando a efetividade do amido de fruta pão, como componente majoritário da matriz, em compor a barreira e contribuição da nanoemulsão de óleo essencial de erva doce no controle da podridão, em sinergismo com a quitosana. Abacaxis recobertos com amido de mandioca e alginato de sódio e mantiveram elevadas notas para aparência geral e intenção de compra (GUIMARÃES *et al.*, 2017).

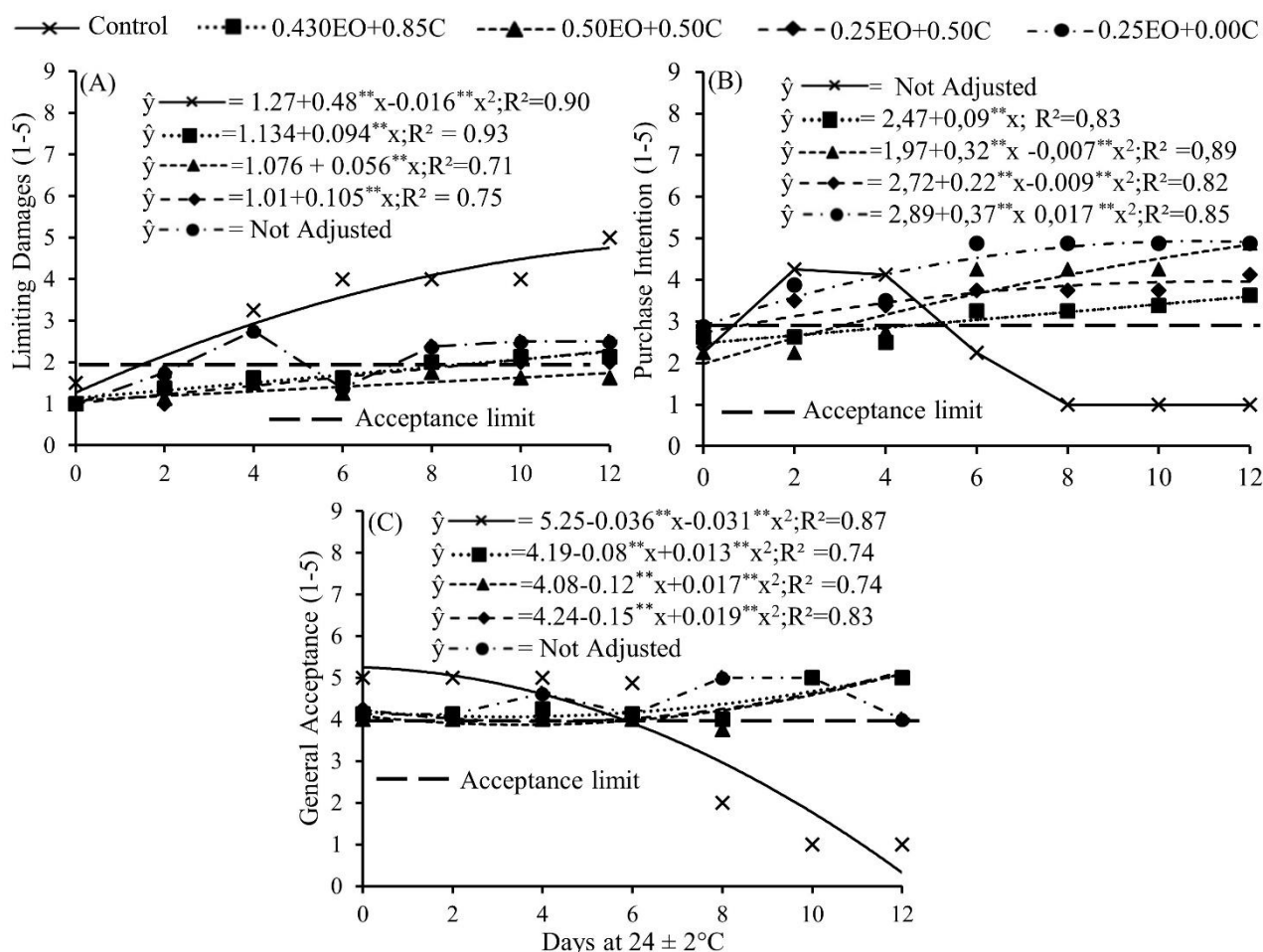


Figura 4. Danos Limitantes (A), Intensão de Compra (B) Aceitação Global (A) em mamão ‘Golden’ recoberto com bicamada. A camada superior com teor fixo de alginato de sódio (0.5%) como matriz e diferentes teores de óleo essencial (EO) de erva doce como nanoemulsulsão, sobreposta na camada inferior, com teor fixo de amido de fruta pão (2.0%) como matriz e diferentes teores de quitosana (C), com % nas camadas (superior + inferior): (0.43EO + 0.85C); (0.50 EO + 0.50C); (0.25 EO + 0.50C); (0.25 EO + 0.00C) e controle (sem bicamada), por 12 dias na condição ambiente (24±2°C e 75% UR). n=4.

Assim, a aceitação global de mamão com a bicamada (0.50 EO + 0.50C) teve notas crescentes até o 12º dia, quando comparados aos do controle cujas notas mais elevadas de aceitação global foram obtidas no 4º dia, quando passaram a ser rejeitados pelos painelistas (Figura 4C). Portanto, mamões recobertos com bicamadas tiveram ganho de vida útil superior a 08 dias no armazenamento ao ambiente, com relação ao controle.

Uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada com as características de qualidade de mamão ‘Golden’ recoberto com bicamada aos 12 dias de armazenamento. A

integração dos dois primeiros componentes principais (PC 1 e PC 2) explicou 81.4% da variabilidade e foi responsável pela formação de três grupos (Figura 5). O PC 1 (64.8%) claramente distinguiu os mamões controle (Group 1) dos recobertos com bicamada (Group 2 e 3). As variáveis perda de massa fresca (FML) e danos limitantes (LD) se correlacionaram negativamente neste componente e a intensidade de odor característico (ICO), intenção de compra (PI), aceitação global (GA) e relação SS/AT se correlacionaram positivamente, formando o Group 3, referente à frutos com bicamada de 0.5 % de EO de erva doce mais 0.50 % de quitosana (0.5EO+0.5C), que obteve maiores escores positivos no PC 1, pelas excelentes características de qualidade (baixa FML e LD e elevada PI, GA e SS/AT), muito superiores aos mamões controle (Group 1) com elevada correlação negativa no PC 1 (alta FML e LD e baixíssima PI, GA e baixa SS/AT).

No PC 2 (16.6 %) observou-se a clara separação do mamão com a bicamada (0.5EO+0.5C) (Group 3), do com bicamada de 0.43 % de óleo essencial de erva doce mais 0.85 % de quitosana (0.43EO+0.85C) e dos com bicamada (0.25EO+0.50C) e 0.25% de óleo essencial de erva doce mais 0 % de quitosana (0.25EO+0.00C) (Group 2). Os teores de sólidos solúveis (SS), a acidez titulável (TA) e a intensidade de odor característico (ICO) se correlacionaram positivamente com o PC 2, por sua vez a firmeza (Firm) se correlacionou negativamente com esse componente. Dessa forma, os frutos com (0.5EO+0.5C) (Group 3), obtiveram elevados scores negativos no PC 2, indicando, portanto, mamões com maior retardo no amadurecimento (maior Firm e menor SS, AT e ICO) comparando com os do Group 2 (menor Firm e maior SS, AT e ICO).

Em conjunto, estes dados indicam que mamões recobertos com a bicamada (0.5EO+0.5C) apresentavam no 12º dia ao ambiente, qualidade bem superior aos frutos sem recobrimento e maior retardo no amadurecimento quando comparado aos frutos recobertos com as demais bicamadas (0.5EO+0.85C, 0.25EO+0.50C, 0.25EO+0.0C), tendo esta formulação, portanto, amplo potencial para ser usada na manutenção da qualidade pós-colheita e aumento da vida útil pós-colheita do mamão ‘Golden’.

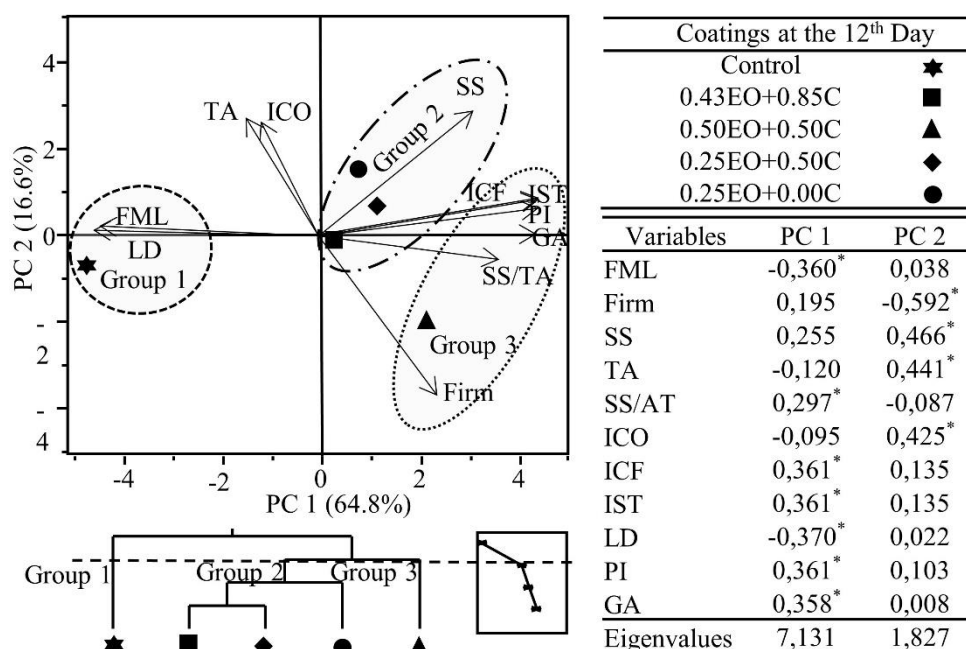


Figura 5. Biplot baseado nos autovetores das características físico-químicas e sensoriais e nos scores de mamão ‘Golden’ com bicamadas no 12º dia na condição ambiente (24±2°C e 75% UR). A camada superior com teor fixo de alginato (A) de sódio (0.5%) e diferentes teores de óleo essencial de erva doce (EO) como nanoemulsão, depositada na camada inferior, com teor fixo de amido de fruta pão (2.0%) e diferentes teores de quitosana (C), com % nas camadas (superior + inferior): (0.43EO + 0.85C), (0.50 EO + 0.50C), (0.25 EO + 0.50C), (0.25 EO + 0.00C), e controle (frutos sem bicamada).

Valores com * são significativos considerando 70% dos maiores autovetores de cada componente em módulo. FML: fresh mass loss; Firm: firmness; SS: soluble solids; TA: titratable acidity; ICO: intensity of characteristic odor; ICF: intensity of characteristic flavor; IST: intensity of sweet taste; PI: purchase intention; GA: general acceptance

CONCLUSÕES

- 1- Amido de fruta pão é uma matriz amilácea adequada para preparo de recobrimentos.
- 2- Mamões com a bicamada (0.50 EO + 0.50C) apresentaram claro retardo no climatério, que ainda evoluía a produção de CO₂ aos 12 dias de armazenamento ao ambiente, com menor perda de massa e firmeza mais elevada, indicando que a maturação avançava.
- 3- A bicamada (0.43EO + 0.85C) antecipou o climatério do mamão para o 8 dia.

- 4- Frutos com camada superior com 0.25% de EO de erva doce e na ausência de quitosana na inferior (0.25 EO + 0.00C) apresentaram avanço na maturação.
- 5- Frutos com a bicamada (0.50 EO + 0.50C) receberam notas elevadas nas intensidades de sabor, odor e gosto doce e ausência de danos limitantes e os escores de intenção de compra foram os mais elevados aos 12 dias, relativo aos com outras bicamadas.
- 6- Em conjunto, uso de bicamada contendo, na camada superior, nanoemulsão de óleo essencial (EO) em alginato (A) e na inferior amido (S) de fruta pão e (C) quitosana (0,5EO + 0,5C) apresenta potencial para a conservação pós-colheita de mamão ‘Golden’, pois foi a mais eficiente em retardar o climatério, manter a qualidade pós colheita e a intenção de compra e aceitação global aos 12 dias na condição ambiente, claramente proporcionando o aumento da sua vida útil pós-colheita.

REFERÊNCIAS

- ALI, A.; MUHAMMAD, M.T. M.; SIJAM, K.; SIDDIQUI, Y. Potential of chitosan coating in delaying the postharvest anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) of Eksotika II papaya. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, n. 06, p. 2134–2140, 2010.
- AZERÊDO, L. P. M.; SILVA, S. D. M.; LIMA, M. A. C.; DANTAS, R. L.; PEREIRA, W. E. Quality of ‘Tommy Atkins’ mango from integrated production coated with cassava starch associated with essential oils and chitosan. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 38, n. 01, p. 141-150, 2016.
- BRASIL, I. M.; GOMES, C.; PUERTA – GOMEZ, A; CASTELL-PEREZ, M. E.; MOREIRA, R. G. Polysaccharide-based multilayered antimicrobial edible coating enhances quality of fresh-cut papaya. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n.04, p. 39-45, 2012.
- CARVALHO, R. L.; CABRAL, M. L.; GERMANO, T. A.; CARVALHO, W. M.; GALLÃO, I. M.; MOURA, C. F. H.; LOPES, M. M. A.; MIRANDA, M. R. A. Chitosan coating with trans-

409 cinnamaldehyde improves structural integrity and antioxidant metabolism of fresh-cut melon.
 410 **Postharvest Biology and Technology**, v. 113, n.03, p.29–39, 2016.

411 CHEN, H. HU, X.; CHEN, E.; WU, S.; MCCLEMENTS, D. J.; LIU, S.; LI, B., LI, Y.
 412 Preparation, characterization, and properties of chitosan films with cinnamaldehyde
 413 nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 61, n. 03, p.662-671, 2016.

414 GARDESH, A. S. K.; BADII, F.; HASHEMI, M.; ARDAKANI, A. Y.; MAFTOONAZAD, N.;
 415 GORJI, A. M. Effect of nanochitosan based coating on climacteric behavior and postharvest
 416 shelf-life extension of apple cv. Golab Kohanz. **Food Science and Technology**, v.70, n. 01,
 417 p.33-40, 2016.

418 GUIMARÃES, G. H. G.; DANTAS, R. L.; SOUSA, A. S. B.; SOARES, L. G.; MELO, R. S.;
 419 SILVA, R. S.; LIMA, R. P.; MENDONÇA, R. M. N.; BEAUDRY, R. M.; SILVA, S. M.
 420 Impact of cassava starch-alginate based coatings added with ascorbic acid and elicitor on quality
 421 and sensory attributes during pineapple storage. **African Journal of Agricultural Research**, v.
 422 12, n. 02, p. 664-673, 2017.

423 KALIA, A.; PARSHAD, V.R. Novel trends to revolutionize preservation and packaging of
 424 fruits/fruit products: microbiological and nanotechnological perspectives. **Critical Reviews in**
 425 **Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 02, p. 159-82, 2014.

426 MARTÍÑON, M. E.; MOREIRA, R. G., CASTELL-PEREZ, M. L.; GOMES, C. Development
 427 of a multilayered antimicrobial edible coating for shelflife extension of fresh-cut cantaloupe
 428 (*Cucumis melo* L.) stored at 4°C. **Food Science and Technology**, v. 56, n. 02, p. 341-350,
 429 2014.

430 MEDEIROS, B. G. S.; PINHEIRO, A. C., CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; VICENTE, A. A.
 431 Development and characterization of a nanomultilayer coating of pectin and chitosan.
 432 Evaluation of its gas barrier properties and application on 'Tommy Atkins' mangoes. *Journal*
 433 *Food Engineering*, v.110, p. 457-464, 2012.

434 MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. 4.ed. Boca
 435 Raton: CRC Press, 2006. 448 p.

436 NWOKOCHA, C. R.; DU, O.; McLAREN, M.; MURRAY, J.; DELGODA, R.; THAXTER, K.;
 437 McCALLA, G.; YOUNG, L. Y. Possible mechanisms of action of the aqueous extract of
 438 *Artocarpus altilis* (breadfruit) leaves in producing hypotension in normotensive Sprague-
 439 Dawley rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 01, p. 1096-1102, 2012.

440 PAREEK. S. **Postharvest ripening physiology of fruits. Innovations in postharvest**
 441 **technology series**. Boca Raton: CRC Press -Taylor and Francis Group, 2016, 664p.

442 PASSOS, F.R.; MENDES, F.Q.; PINTO, M.C.E; ARAÚJO, E.A.; CARVALHO, A.M.X.
 443 Propolis extract in postharvest conservation of Solo papaya cv. 'Golden'. **Semina: Ciências**
 444 **Agrárias**, v. 37, n. 06, p. 4039-4050, 2016.

445 PAVELA, R., ŻABKA, M., BEDNÁŘ, J., TŘÍSKA, J., VRCHOTOVÁ, N. (2016).
 446 composition and insecticidal activity of essential oils obtained from the aerial parts or seeds of
 447 fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) **Industrial Crops and Products**, v.83, n.03, p. 275–282,
 448 2016.

449 RODRIGUES, A. A.M.; SILVA, S. M.; DANTAS, A. L., SILVA, A. F., SANTOS, L. S.;
 450 MOREIRA, D. N. Physiology and postharvest conservation of 'Paluma' guava under coatings
 451 using jack fruit seed-based starch. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 03, p. 01-08,
 452 2018.

453 SEVERINO, R.; FERRARI, G.; VU, K. D.; DONSI, F.; SALMIERI, S.; LACROIX, M.
 454 Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential
 455 oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against *Escherichia coli* O157:H7
 456 and *Salmonella Typhimurium* on green beans. **Food Control**, v.50, n.02, p.215-222, 2015.

457 SIPAHI, R.E.; CASTELL-PEREZ, M. E.; MOREIRA, R. G.; GOMES, C.; CASTILLO, A.
 458 Improved multilayered antimicrobial alginate-based edible coating extends the shelf life of

459 fresh-cut watermelon (*Citrullus lanatus*). **Food Science and Technology**, v.51, n.02, p. 9-15,
460 2013.

461 VERSINO, F.; LOPEZ, O. V.; GARCIA, M. A.; ZARITZKY, N. E. Starch based films and
462 food coatings: An overview. **Starch-Stärke**, v. 68, n.01, p. 1-12, 2016.

463 XIN, Y., CHEN, F., LAI, S., YANG, H. Influence of *chitosan*-based coatings on the
464 physicochemical properties and pectin nanostructure of Chinese cherry. **Postharvest Biology**
465 **and Technology**, v. 133, n.01, p. 64-71, 2017.

Properties of a biodegradable polymer bilayer coating based on breadfruit starch, chitosan and nanodispersion of fennel essential oil

Abstract The development of biodegradable coatings based on low-cost, non-conventional edible raw materials is an alternative for new packaging with high added value for fruits and vegetables, as they present microbiological and chemical physical stability during their use, as well as ensuring the maintenance of quality post harvest of fruits. Therefore, the objective of this work was to develop and characterize bilayer coatings with bread fruit starch, chitosan and herb essential oil nanodispersion. In the starch used, high percentages of amylose and amylopectin were identified. Through experimental planning, coating formulations with microbiological properties to control anthracnose, physical and chemical, ideal for conservation, were developed. Coating formulations in bilayers, with percentages from 0.25% and 0.5% of essential oil and chitosan, acted synergistically in combating *Colletotrichum gloeosporioides*, as well as in the formation of bilayers with desirable properties to form an excellent coating

Words – Keys: Antifungals; *Artocarpus altilis*; Bilayer; *Colletotrichum gloeosporioides*; *Foeniculum vulgare Dulce*.

1. Introduction

The use of coatings from renewable raw materials has been characterized as an emerging technology to delay ripening and maintain the postharvest quality of fruits and vegetables (Rodrigues et al., 2018; Guimarães et al., 2017), which they present the advantage of enabling the addition of active ingredients or antimicrobial substances, such as essential oils synergistically, and inhibit the development of diseases and prolong post-harvest shelf life (Ali et al., 2011; Alboofetileh, 2014). These coatings enable the preservation and/or improvement of the appearance of fruits, selective permeability to gases (CO₂ and O₂), antifungal and mechanical properties, non-toxic and of low cost (Elsabee & Abdou, 2013).

The use of different renewable sources comes as an innovative alternative for the development of biodegradable films, such as bread fruit starch (*Artocarpus altilis*), which has physical, chemical and rheological characteristics suitable for the preparation of new food products (Adebowale et al., 2005; Ricon & Padilha, 2004). Starch associated with other usual raw materials, which are also biodegradable, can be used for the development of coatings and/or edible films. Among these, there is sodium alginate, a polysaccharide that has unique colloidal properties with the ability to form strong gels through reaction with polyvalent metallic cations (Jeang, 2013), emulsifier and thickener (Alboofetileh et al., 2014).

Another polysaccharide that has been widely used as part of the formation of coatings is chitosan, which is characterized as a biofunctional raw material, an excellent film-former with antimicrobial, physical and mechanical properties (Elsabee & Abdou 2013). This antimicrobial effect of chitosan seems to be enhanced when, associated with essential oils, oregano (Acosta et al., 2016), cinnamon, ginger (Noshirvani et al., 2017), thyme (Perdones et al, 2016) and anise (Caleja et al., 2015; Lima et al., 2012; Azerêdo et al., 2016).

However, the use of essential oils can present disadvantages, due to their high volatility, insolubility in water and strong odor, which can cause physiological disorders when applied directly.

(Ghosh, Mukherjee & ChaNDRASEKARAN, 2014). In addition, the application of these antifungal agents can cause necrosis in fruits, when applied directly to the surface (peel). One of the alternatives to minimize the incidence of disorders is to modify the application condition, the oil in the matrix and then in the fruit. In this sense, the use of nanotechnology is a viable alternative for the formation of new coatings and/or films, without damaging the fruits, through the elaboration of coatings (Zambrano-Zaragoza et al., 2014).

Nanoemulsion is a way to incorporate some active agents, such as essential oils, increasing their availability, controlling their release and minimizing their degradation. Nanoemulsions are lipid droplets between 10 and 200nm dispersed in an aqueous phase, in the presence of a surface-active agent, which involves each drop of oil. These offer many potential advantages over conventional emulsions, as they provide greater stability, ability to modulate product texture and bioavailability of lipophilic components (Cerqueira et al., 2014). Its production takes place through a high energy process, employing high shear force, using the stable combination of oil-in-water phases (Abbas et al., 2013; Cerqueira et al., 2014; Komaiko & MCCLEMENTS, 2015; Silva et al., 2013; al., 2012).

Combined with nanotechnology, the application of coatings on the fruits in the form of a bilayer is an alternative that can be used to overcome the challenges of incorporating components that do not adhere to the surface of the product, during immersion in coatings, such as essential oils directly applied. This technique consists of the physical and chemical union of overlay layers, with cationic and anionic characteristics: oppositely charged polyelectrolytes (Soliva-Fortuny, 2010), which are applied as the previous layer dries. This procedure has shown promising results for papaya (Brasil et al., 2012); pineapple (Mantilla et al., 2013); watermelon (SipahI et al., 2013) and melon (Martíñon et al., 2014). In this sense, the objective of this work was to develop and characterize, physicochemical and microbiological of bilayer coatings, formed from bread fruit starch, chitosan and an anise essential oil nanodispersion.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Material

For the development and characterization of the bilayer coating, the following were used: fruit species – bread obtained from planting at Engenho Santa Tereza at 6°55'46.6"S 35°41'35"W, chitosan (Polymar SA) and grade sodium alginate food (Dynamic), fennel oil (*Foeniculum vulgare* Dulce) (Ferquima), surfactant (Twenn 40) and glycerol plasticizer (Dynamics). Purified *C. gloeosporioides* strain and Potato Dextrose Agar culture medium were used in the laboratory. The experiment was carried out at the Post-Harvest Technology and Biology laboratory, at the Federal University of Paraíba, campus II- Areia.

2.2 Methods

2.3 Extraction of the starchy mass

Fruits were harvested at the stage of green maturation (twelve weeks) and ripe (sixteen weeks), they were sanitized in a chlorinated solution at 200ppm, then peeled and the pulp cut into small pieces

and placed in an industrial blender (SPOLU) for crushing, with aid of distilled water, until obtaining a homogeneous and thin mass. Then the mass was pressed into cotton fabric. The filtrate was left to rest for 60 minutes at room temperature of $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. After decanting, the supernatant was removed and the mass obtained was resuspended three more times in distilled water for total starch extraction (Schoch & Maywald, 2001). Then, the starch obtained was dried in a Model LD 1500 lyophilizer (Terrone) for 36 hours at -54°C .

2.4 Composition of Bread Fruit Starch

The chemical composition of the starch extracted from the bread fruit was determined according to the Instituto Adolfo Lutz (2008), in the determination of ash, moisture and total starch, and the amylose and amylopectin, through a standard curve, described by Martinez & Cuevas (1989).

2.5 Swelling Power, Solubility Index and Morphology of Starch Granules

Swelling power and solubility index were determined by the Leach, McCowen & Schoch (1959) methodology. 8g of starch was weighed and solubilized in 100mL of distilled water, the tubes were kept in a water bath at 60°C , 70°C , 80°C and 90°C for 30 minutes and shaken every 5 minutes in a solution shaker. Then the tubes were centrifuged at 3500 rpm for 10 minutes, the supernatant was measured using a beaker; 1.5mL of solution was removed to determine the residue. The results were calculated using equations (1):

$$\text{Swelling power (g/g)} = \frac{C}{Ma} \quad (1)$$

$$\text{Solubility Index (\%)} = \frac{10 \times V \times R}{Ma} \quad (2)$$

The shape of the starch granules was evaluated by an electron microscope under a microscope (Olympus BX53F), with a 1000x lens, and an Olympus DP73 camera, where a 1% starch solution was placed on slides and photos were taken with the aid of a computer capture program of images.

2.6 Preparation of Coatings for Elaboration of Nanoparticulate Bilayers with Essential Oil of Fennel.

For the elaboration and evaluation of bilayers with nanoparticles, a 2^2 DCCR factorial design (Central Rotational Composite Design) was developed, with 4 factorial points, 4 axial points and 3 central points, totaling 11 tests. As independent variables: chitosan solutions (Q), associated with a gelled solution of 2% starch, plus 0.25% glycerol (first layer) and to obtain the nanoparticulate, percentages of anise essential oil (OEED), with 0.5% gelled sodium alginate solution, 0.5% Tween 40®, plus 0.25% glycerol (second layer) and forming bilayers.

As dependent variables, the best results were considered regarding the percentage of inhibition of *C. gloesporoides* growth, miscellaneous growth rate, number of spores produced, as well as physical analysis, applied to nanoparticulate bilayers. The results related to these determinations were used to evaluate the best and most suitable formulations, which can be applied to intact fruits.

To form the bilayers, Ultra Turax at 15000 rpm for both layers and Ultrasound (Hielscher ModeloUP200 st) were used according to the methodology described by Nejadmansouri et al.; (2016) Sanchez-Orteg et al., (2016) both with modifications. The preparation (process) and obtaining (product) of the best formulation obtained in this study is protected by the submission of patent application number: BR102017022068-0, protocol: 870170078008.

2.7 Microbiological Analysis of Nanoemulsion of Fennel Essential Oil Bilayers

Starch, chitosan, fennel nanoparticles, alginate, Tween 40® were used to enrich the culture media, based on Potato Dextrose Agar (BDA). Medium preparation was carried out according to the manufacturer, and the inclusion of the ingredients of the bilayer coatings was carried out in the following order, inside the culture medium: starch gelled at 90°C, chitosan solutions, Tween 40® and finally, nanoparticulates based on sodium alginate and fennel essential oil. Discs measuring 4.0mm in diameter with spores of *C. gloeosporioides* were isolated from papaya contaminated with Anthracnose. The determination of the effect of the concentrations of the biodegradable components on the fungus development was carried out at a temperature of 25°C under a photoperiod of 12 h, for nine consecutive days,

2.8. Inhibition Percentage of *C. gloeosporioides*

The inhibition of the growth of *C. gloeosporioides* was determined according to Guerreiro et al, (2015), with the inocula placed in Petri dishes with a diameter of 90mm. In addition to these, inocula were also applied in petri dishes, containing only culture medium, enriched with starch and without the presence of antifungal compounds. For each formulation, six repetitions were performed, totaling 72 plates. The diameter of the colonies was measured daily with the aid of a digital parking meter, and the inhibition was calculated using equation (3):

$$\text{Inhibition of mycelial growth (\%)} = [(C-T / C) \times 100 \quad (3)$$

2.9. Mycelial Growth Speed Index

The mycelial growth index of the inocula was calculated according to the methodology described by Oliveira (1991), according to equation (4):

$$\text{IVCM} = (D - D_a) / N \quad (4)$$

2.10. Spore Number Count

The plates that showed fungus growth received 10ml of sterilized double-distilled water to resuspend the colonies, then 0.5ml of this solution was removed and deposited in the Neubauer chamber to count the number of spores. Number of cells counted was equal to the mean multiplied by the dilution factor. To obtain the number of spores, equation (5) was applied:

$$\text{Number of cells/ml} = \frac{\text{Total number of cells} \times \text{dilution factor} \times 10,000}{\text{Number of counted quadrants}} \quad (5)$$

2.11. Image Capture of *C. gloeosporioides* Fungus

The image of the fungus development was captured through an electron microscope (Olympus BX53F), with a 1000x lens, and an Olympus DP73 camera, against the inhibition of antifungal substances.

2.12. Characterization of Nanoparticulate Essential Oil of Fennel Bilayers.

For physical-chemical characterization of nanoparticulate bilayers, film formation was necessary. For this purpose, 30mL aliquots of the first layer were made available in 90mm Petri dishes, previously sanitized and after pre-drying at room temperature $25 \pm 2.0^\circ\text{C}$, 20mL of solution formed by the nanoparticulates was added to form the second layer. After complete drying of the films, they were placed in an acrylic chamber, at a temperature of 21°C and 55% humidity for three consecutive days.

2.13. Instrumental Determination of Color and Thickness

The determination of color was performed with a colorimeter (Konica Minolta), with a reading system used CIELAB, represented by the following coordinates of L^* (brightness), a^* (-a green, +a red) b^* (-b blue, + yellow b). In addition, these parameters were used to determine the color difference between the formulations. Thickness was measured in micrometer (COSA) precision. For each repetition, for both determinations, five distinct points were measured (ends and central point) on both sides of the first and second layers. To calculate the ΔE , the following was used:

$$\Delta E = (L_0^* - L^*)^2 + (a_0^* - a^*)^2 + (b_0^* - b^*)^2 \quad (6)$$

2.14. Solubility

The solubility in water was determined according to the methodology proposed by Gontard et al., (1992), with modifications. Initially, the dry mass of 2cm diameter film samples was determined as a function of their moisture in a drying and sterilization oven, kept at 105°C for 24 h, then the samples were weighed (m_i) to determine the initial mass and immersed in 50mL of distilled water, in an Erlenmeyer flask and kept under agitation at 175 rpm, at 25°C , for 24 consecutive hours, using a shaking table (QUIMIS). After this period, the samples were removed from the water and the dry mass (m_f) was determined under the same conditions described above, to obtain the final dry mass. Solubility in water was expressed as a percentage of solubilized material, calculated from equation (6):

$$\text{Solubility (\%)} = \frac{\text{Initial mass} - \text{final mass} \times 100}{\text{Initial Mass}} \quad (7)$$

2.15. Permeability to water vapor

Water vapor permeability was determined by the gravimeter method, according to the ASTM test (1995), modified by Gontard et al. (1992). The films, in disc shape with 4.5 cm in diameter, were placed as an integral part of the capsule lids, containing distilled water (RH = 100%; 0.4297 x 104 Pa vapor pressure), forming a membrane in order to ensure that moisture diffusion took place exclusively through the films. The cells were placed inside a closed chamber containing silica gel (RH = 50%; 0 Pa vapor pressure) in an air-conditioned room at 22 ± 2.0°C. The capsules were weighed on an analytical balance, with a precision of 0.0001g, every 12 hours, for 7 consecutive days. Permeability was calculated using equation (8):

$$PVA = \frac{G \times V}{H \times T (P_1 - P_2)} \quad (8)$$

2.16. Opacity

Apparent opacity was determined according to a methodology proposed by Gontard, Guilbert & Cuq (1992) by spectrophotometer. The samples were cut into 1cmx 4 cm rectangles and positioned on the inside of the glass cuvette, perpendicularly to the direction of the light beam, to obtain values of apparent opacity, defined as the area under the curve versus wavelength, obtained by scanning in the visible region from 400 to 800 nm.

2.17. X-Ray Diffraction and Fourier Transform Infrared Absorption Spectrometry (FTIR)

X-ray diffraction was performed on samples of bilayer coatings nanoparticulate bilayer films in an XRD-7000 Shimadzu apparatus, using copper K α radiation (1.5418 Å), with a voltage of 40kv and a current of 30mA, under a 2 θ angle varying from 5.0 and 70.0 degrees at a speed of 2°/min. The FTIR was determined using a scanning range from 4000 to 650 cm⁻¹ in Spectrum 400 from Perkin Elmer.

2.18. Scanning Electron Microscopy (SEM):

The microstructural analysis of the morphology of the bilayers was carried out in a Phenon Pro – X bench scanning electron microscope, with 750x magnification for lower surface (first layer), upper surface (second layer) and cross section, with 1500x magnification, depth of focus 1mm, 15 KV resolution and 270Pa pressure).

2.19. Statistical Analysis

To evaluate the effect of the interaction of oil and chitosan concentrations, the response surface technique was used, and a polynomial regression analysis was performed for the main effect, testing up to a quadratic level. The significance of up to 5% probability and coefficient of

determination (R²) above 60% were considered. Software SAS 9.3 (2011) was used for the analyses. To evaluate the parameters, Tukey's test $p < 0.05$ was also applied.

3. Results and Discussion

3.1 Physical, Chemical and Functional Characteristics of Bread Fruit Starch (*Artocarpus altilis*)

The chemical composition, as well as the yield of the extraction of starchy mass from the bread fruit pulp, in fruits with green (10 weeks) and complete (16 weeks) maturity stage, is shown in Table 1. The presence of a high amount of mucilage, a natural substance of this fruit, made the extraction process difficult, making separation difficult, in 10-week-old fruits, obtaining 25.71% of starchy mass. In fully developed fruits at 16 weeks, about 72.40% of starchy mass was obtained, in relation to the fresh mass of the fruit. When determining the percentage of starch, the result found in this study was 40.03% and 80.2%, respectively. This last value was similar to that determined by Adebowale et al. (2005), which obtained a value of 84.48%, also for bread fruit starches. When compared to another source of starch, the content was lower than that found by Madruga, et al (2014), when they determined starch percentages in 92.8% soft jackfruit and 94.5% hard jackfruit seeds.

These discrepancies between the studied species may be related to the type of cultivation, chemical composition of the fruit, and may also contain traces of other constituents of the food matrix. As ash, which was identified as content of 0.67% and 0.44%; values lower than those found by Latchoumia, et al (2014), who identified 0.79% in dry mass and higher than Adebowale et al. (2005) 0.33%, all for bread fruit. About the moisture content present in the bread fruit starch found was 19.64% and 17.71%. The low value of this moisture is related to the way in which the fresh matter was dried, which was submitted to the freeze-drying process. The contents of amylose and amylopectin found were also high, in percentages of 23.14%, 51.96% and 13.78%, 28.19%, respectively. It was noticed that there is variation in the levels of amylose and amylopectin and that these were influenced by the ripening stage of the fruits. The presence of this high level of amylose in starches, for ripe fruits, and its use in the preparation of biodegradable films, leads to better mechanical resistance, in addition to gas barrier properties (HOOVER, et al, 2010).

The swelling power and solubility index (Figure 1 G, H) were monitored during room temperature (20°C) and heating until complete gelatinization of the starch granules (90°C). Note that starch granules only show a change in their conformation after the heating temperature of 40°C. From 70°C onwards, there was a prominent onset of swelling and granules solubility, 10.02 g/g and 4.78%; and with apex at 80°C with 14.36 g/g and 8.5%, respectively decreasing at 90°C. This swelling power was shown to be dependent on the increase in temperature, providing a weakening of the bond strengths inside the granule, facilitating the entry of water into the intermolecular spaces. When

252 studying the swelling power of starch granules obtained from bread fruit, Waliszewski et al. (2003)
253 and Adebowale et al. (2005), observed that the temperature of 70°C had the greatest effect on granule
254 swelling.

255 These results, when compared to other starchy matrices, such as starch obtained from jackfruit
256 kernels, which obtained gelatinization temperature results at 95°C, had lower solubility rates by 1.6%,
257 however, the swelling power was higher 17.5g/g (MADRUGA et al., 2014). This difference may be
258 related, the amount of water absorbed depends on each type of starch, and its conformity, that is, its
259 composition in terms of amylose and amylopectin, as well as the size of the granules (Ricon & Padilla,
260 2004). Also according to Singh, Sandhu & Kaur (2004), the low swelling power and solubility may be
261 associated with the presence of higher concentrations of amylopectin,
262 as they present greater crystallinity.

Table 1. Pulp yield and chemical composition of breadfruit in two maturity stages

Maturity	Pulp Yield (%)	Starch (%)	Amylose (%)	Amylopectin (%)	Moisture (%)	Ashes (%)
Half ripen	25.71±1.54 ^b	40.03±0.66 ^b	23.14±0.26 ^b	13.78±0.53 ^b	19.64±0.78 ^a	0.67±0.44 ^a
Fully ripen	72.40±1.82 ^a	80.2± 0.74 ^a	51.96±0.12 ^a	28.19±0.58 ^a	17.71±1.02 ^b	0.44±0.73 ^b

Means (± standard deviation) followed by the same letter in the column do not differ by the Tukey test at p <0.05; n=5.

The gelatinization capacity of the starch granules, can be seen in Figure 1, there is a modification in the starch granules morphology, from the increase of the temperatures, as observed during the swelling and solubility. At the same time, that there was an increase in the levels of swelling power and solubility, the swelling of the granules was clear from the temperature of 70°C. The modification of this is clearly distinct, through the increase in temperature, making the grains that at 20°C present greater dispersion, making them more grouped by the action of temperature, than through heating the starch dispersions in the presence of excess water, their granules swell to temperatures that cause the granules to break, with destruction of the molecular order and irreversible changes in their properties. When there is total transformation of the granules, at specific temperatures, it is called gelatinization temperature (SOUSA & ANDRADE, 2000). This was clear in other starchy matrices such as babassu mesocarp starch, studied by Maniglia & Tapia-Blacido (2016), in which high temperatures were needed in this matrix, from 75°C to 95°C for total swelling and solubility of starch granules.

The nanoemulsions made with a filmogenic solution of sodium alginate and anise essential oil are shown in Figure 2. It can be seen that there was dispersion of oil particles within the aqueous phase (0.50% sodium alginate) and that the size of the particles were distinct between the formulations. the application of high force such as ultraturaz and ultrasound application, were efficient in the dispersion process and essential oil droplet sizes.

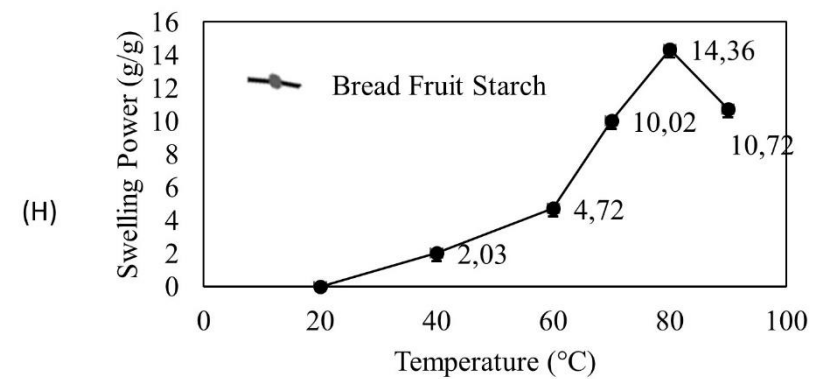
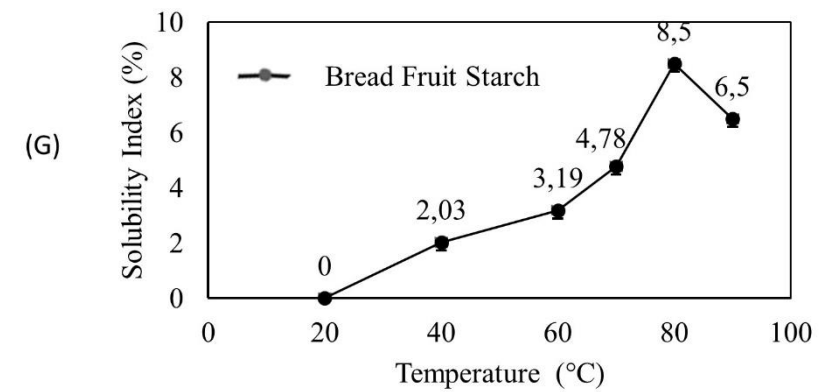
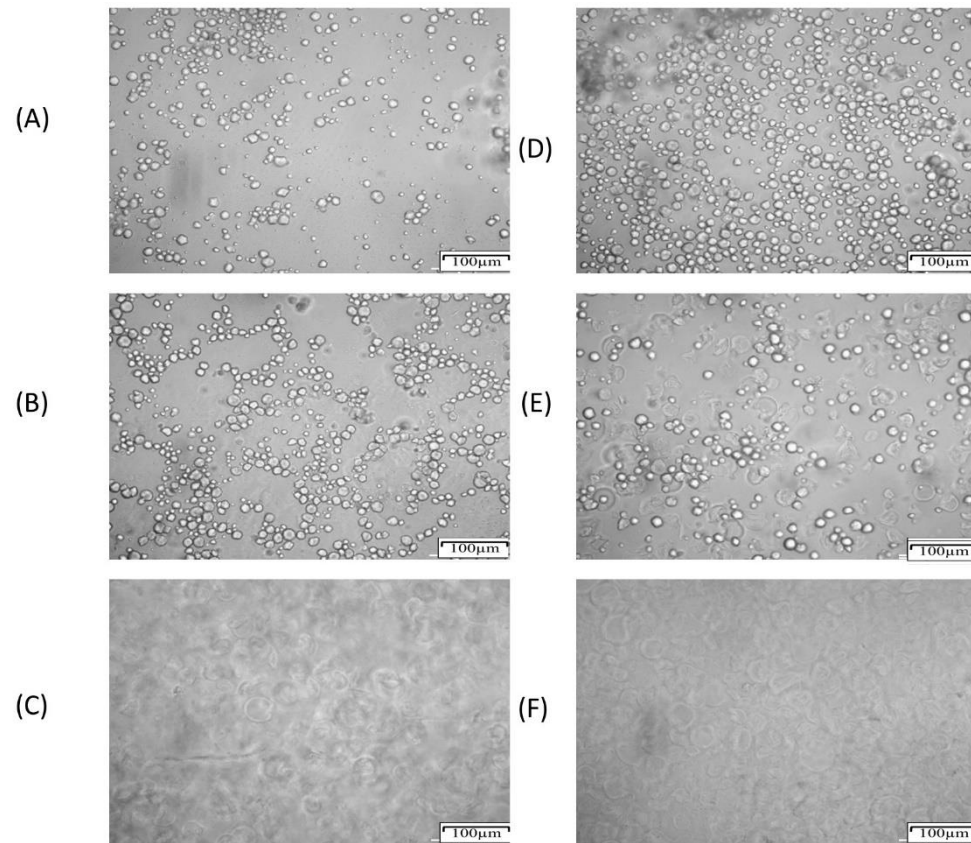
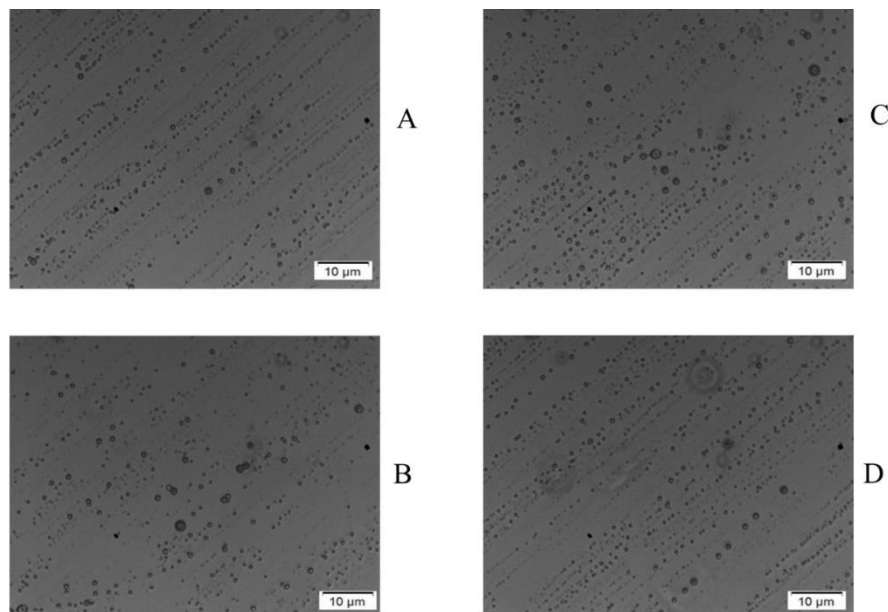


Figure 1. Changes in the bread fruit starch granules during heating at temperatures of 20° C (A), 40° C (B), 60° C (C), 70° C (D), 80° C (E), until total gelatinization at 90° C (F), solubility index (G), and swelling power (H).

321



322

323 **Figure 2.** Images of the film of sodium alginate (0.50%) in combination with dispersion of fennel
324 essential oil at concentrations of 0.07% (A), 0.25% (B), 0.43% (C) and 0.50% (D) as nanodispersion.

325

326 **3.2. Physical Chemical Properties of Nanoparticulate Bilayers**

327 The nanoparticulate bilayers in this study showed statistically significant results for the physical
328 parameters of permeability, thickness, opacity, color parameters L, A, B, AE. As for the solubility
329 parameter, it had no significant effect on the physical and chemical characteristics of the bilayers
330 (Table 2). The formation of nanoparticulate bilayers was possible through the physical chemical
331 interaction of sodium alginate, as it presents anionic characteristics, composed of linear chains of α -L-
332 glucuronic and β -D-manuronic acid, which in the presence of ions such as Ca^{++} form hydrogels,
333 films, spheres, micro- and nanoparticles, with encapsulation capacity and chitosan, as it is a cationic
334 polymer consisting of 1 4-linked 2-Amino-2-deoxy-bD-glucose (Pereira et al., 2014; Helander et al.,
335 2001; Li et al., 2006; Chung & Chen, 2008). Studies also show the use of these constituents, in order to
336 obtain stability in bilayers with emulsions, applied to fruits (TREVINO) -GARZA et al., 2017;
337 Martiñon et al., 2014; Medeiros et al., 2012).

338 Taking into account the results explained in this work, referring to permeability determined in the
339 formulations of nanoparticulate bilayers, it was noticed that the higher the concentrations of fennel and
340 chitosan essential oil, the higher the permeability levels of the bilayers. This occurrence is mainly due
341 to the presence of material with a lipid character, which provides greater tortuosity and, consequently,
342 greater permeability (Perez-Gago & Krochta, 2001). An estimate of the barrier property of
343 nanoparticulate bilayers is the loss of water molecules that is obtained through the film; this fact

simulates the possible dehydration that foods such as vegetables can suffer when using nanodispersion bilayers, such as edible packaging (Ma, Chang & Yu, 2008). As for the thickness content, note that values from 0.07% to 0.50% of nanoparticles were significant in terms of the production of thick layers. When evaluating these results, with those determined by Acevedo-Fani et al., (2015), it shows that the nanoparticulate bilayers, in all formulations, had lower thicknesses than biodegradable films made with nanoemulsions based on 50mm sodium alginate, essential oil of 46mm thyme, 42mm lemongrass and 38mm sage.

The compositions of the bilayers did not differ statistically regarding the percentage of solubility and the color parameter *L* (Table 2). As for opacity, it can be seen that the lower or no percentage of nanoemulsion, the lower the percentage of opacity of the bilayers. Therefore, the presence of essential oil makes the matrix more opaque. In formulations 03 and 05 the opacity was less than 2%, in the other bilayers the association with different concentrations of chitosan exhibited higher percentages of opacities, especially in the formulation containing 2% starch (first layer), plus 0.25% of nanoemulsion in the second layer, which presented the highest percentage of 4.76% opacity. This property is associated with the presence of only fennel essential oil nanoparticles, which generate light blocking in order to inhibit food oxidation (Tian, Decker & Goddar, 2013; Kannat, et al., 2012) and that also improve the overall appearance of the product, without interfering or misleading the consumer (Jridi et al., 2014; Peng & Li, 2014). Still on the optical properties of the biodegradable bilayers, the chromaticity system *L*, *a*, *b* and AE are also expressed in Table 2. The higher the content of nanoparticles and chitosan, the higher the values found for parameter *a*, which indicates the presence of red pigments, more especially, the parameter *b* and AE stood out for higher values, indicating a greater presence of yellow colored pigments, visibly found in chitosan solutions and in fennel essential oil nanoparticles. For the color difference (AE), which reflects the influence of variables *L*, *a* and *b*, it is associated with loss of pigments, observing these parameters it is possible to see that the higher the value found in AE, the more opaque the solution, with values found in formulations with higher concentrations of these constituents.

Table 2. Water vapor permeability, solubility, thickness, opacity, color *l*, *a*, *b* and ΔE of formulations of a bilayer coating of sodium alginate (0.5%) in combinations with different levels of nanoemulsion of fennel essential oil in the first layer and bread fruit starch (2%) and different levels of chitosan in the second layer.

Bilayer Coatings	Formulations (%)		Water Vapor Permeability (g.mm m-2d.kpa)	Solubility (%)	Opacity (%)	Thickness (nm)	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	ΔE
	First Layer	Second Layer								
01	0.07EO	0.15C	6.27±0.17 ^{ab}	60.01±0.47 _a	2.52±0.24 _{cd}	32.07±0.60 ^{ab}	79.4±0.40 ^a	1.03±0.21 ^a	15.60±0.25a	18.41±0.94c
02	0.43EO	0.15C	6.77±0.20 ^{ab}	61.94±0.46 _a	2.08±0.11 _{de}	32.07±0.55 ^{ab}	80.80±0.17 _a	0.73±0.15 ^{ab}	13.67±0.42b	14.79±0.14c
03	0.07EO	0.85C	5.44±0.49 ^{ab}	61.24±0.56 _a	1.88±0.08 _e	33.13±0.29 ^a	80.1±0.46 ^a	0.60±0.10 ^b	15.17±0.21a _{bc}	24.58±0.27b
04	0.43EO	0.85C	7.24±0.37 ^a	61.27±0.17 _a	3.13±0.09 _b	28.67±0.31 ^{bc}	79.57±0.27 _a	0.83±0.06 ^{ab}	15.30±0.46a _b	31.69±0.21a
05	0.00EO	0.50C	5.61±0.62 ^{cd}	66.74±0.65 _a	1.82±0.16 _e	25.87±0.22 ^c	79.87±0.46 _a	0.73±0.12 ^{ab}	15.57±0.40a	25.52±0.66b
06	0.50EO	0.50C	5.20±0.45 ^a	66.51±0.80 _a	2.85±0.18 _{bc}	27.60±0.83 ^{bc}	80.17±0.21 _a	0.87±0.15 ^{ab}	15.87±0.61a	28.22±0.78a
07	0.25EO	0.00C	4.02±0.73 ^d	59.96±0.60 _a	4.76±0.33 _a	17.87±0.50 ^d	81.00±0.30 _a	0.63±0.06 ^b	13.4±0.17b	13.05±0.28c
08	0.25EO	1.00C	4.36±0.65 ^{cd}	68.58±0.88 _a	2.17±0.06 _{de}	21.73±0.50 ^{de}	81.1±0.20 ^a	0.57±0.25 ^b	13.03±0.50b	11.56±0.20c
09	0.25EO	0.50C	6.17±0.17 ^b	61.03±0.17 _a	3.23±0.22 _{bc}	29.4±0.44 ^{abc}	81.07±0.35 _a	0.67±0.15 ^b	14.13±0.49a _b	28.72±0.38a
10	0.25EO	0.50C	6.21±0.39 ^b	57.19±0.95 _a	3.05±0.31 _{bc}	29.87±0.73 ^{abc}	79.4±0.18 ^a	0.70±0.10 ^{ab}	15.3±0.10ab	32.86±0.49a

11	0.25EO	0.50C	6.48±0.30 ^{ab}	67.72±0.51	2.80±0.17	29.87±0.42 ^{abc}	79.93±0.42	0.73±0.06 ^{ab}	15.60±0.44a	27.74±0.21a
				a	bc		a			
Fixed concentratio ns Pr>F	Sodium alginate (0.50%)	Bread Fruit Starch (2%)								
			<0001	0.4597	<0001	<0001	0.2686	0.0074	<0001	0.0120

EO= Oil Essential; C= Chitosan. *number of spores x10⁶. Values refer to the mean ± standard deviation of four replications; Means followed by the same letters in the column do not differ by the Tukey test (p <0.05).

3.3. Sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* to Nanoparticulate bilayers

The development of the fungus in these same formulations mentioned above also had an effect on the production of mycelial growth and spore production (Table 3). In these results, the use of fennel essential oil nanoparticles and chitosan were expressive in their antifungal action; this action may be associated with the presence of phenolic compounds as well, as they present harmful bioactivity to mycelial germination of fungi such as *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* and *Fusarium* (Pai et al., 2010; Siingh et al., 2006; Soylu et al., 2007).

Applying the formulations to Golden papaya fruits, it is also noticed that there is effectiveness in combating the development of anthracnose. When compared to the control (culture medium and bilayers applied with bread fruit starch and alginate), applied in vitro and in vivo, their behavior was differentiated according to each concentration used. In vitro, the same behavior occurred, which was perceived in the percentage of inhibition, in fruits there was development of this phytopathology, however, in smaller proportions in fruits with formulations that were effective in combating anthracnose. Thus, it denotes that the greatest aggressions are related to nanoparticulate bilayers, which have a lower content of natural antifungal inducers.

These results corroborate the images obtained from the nanodispersion bilayer coatings where they had lower concentrations of nanodispersion (0.07%), associated with concentrations of 0.15%, and 0.85% of chitosan, in addition to the formulation with the presence of only an antifungal agent, 0.50% chitosan and a control, where *C. gloeosporioides* developed (Figure 3). In which the use of chitosan combined with essential oils, both in lower percentages, can be part of a group of antimicrobials with an antifungal effect (Elsabee & Abdou, 2013) in fruits such as grapes (Pelissari et al., 2009; Oliveira et al., 2014); mango (Cissé et al., 2015); guavas (Aquino, Blank & Santana, 2015); fresh blueberry (Yang et al., 2014). However, they were not effective, when applied in this study, associated or not, in proportions of 0%, 0.07% and 0%, 0.15%, 0.5% and 0.85%. The synergy between these antifungals was only evident when combined in 0.25%, 0.43%, 0.5% and 0.5%, 0.85% and 1.0% essential oil and chitosan formulations, respectively. The effect on the morphology of the fungi can be evidenced through the images observed in the electron microscopy (Figure 5); where it was observed that there are differences in the uniformity of the mycelia and number of conidia, compared to the control. In Petri dishes, the behavior of this fungus is also evident, in the formulations used, in which there was total inhibition in concentrations of OEED that acted synergistically with concentrations of chitosan.

These results are similar to those found by Avanço, et al (2017), when they studied the essential oil of turmeric effect on the production of *Fusarium verticillioides*, in which they perceived the antifungal effect on the morphology of the conidia found. By associating chitosan with the yeast *P. membranefaciens*, in combating *C. gloeosporioides* in citrus, Zhou, Zhang and Zeng (2016) also

noted that this antifungal had an effect on the morphology of mycelia and conidia. The effects observed by the action of essential oils include loss of cell membrane integrity, and consequently act by inhibiting development, as they also present in their constitution the presence of terpenes (Alburquerque et al., 2016; Bonfim et al., 2015; Yamamoto-Ribeiro et al., 2013).

Table 3. Spore production and mycelial growth rate index (IVCM) in formulations of a bilayer coating of sodium alginate (0.5%) in combinations with different levels of nanoemulsion of fennel essential oil in the first layer and bread fruit starch (2%) and different levels of chitosan in the second layer *in vitro*

Bilayered Coatings	Formulations (%)	Spores/mL*	Growth	Bilayered Coatings
	First Layer	Second Layer		
Control	Distilled water	Distilled water	120.0 ± 2.09 ^a	Control
01	0.07EO***	0.15C	39.67 ± 1.73 ^b	01
02	0.43EO	0.15C	0.00 ± 0.0 ^c	02
03	0.07EO	0.85C	37.0 ± 1.73 ^b	03
04	0.43EO	0.85C	0.00 ± 0.0 ^c	04
05	0.00EO	0.50C	56.17 ± 2.0 ^a	05
06	0.50EO	0.50C	0.00 ± 0.0 ^c	06
07	0.25EO	0.00C	0.00 ± 0.0 ^c	07
08	0.25EO	1.00C	0.00 ± 0.0 ^c	08
09	0.25EO	0.50C	0.00 ± 0.0 ^c	09
10	0.25EO	0.50C	0.00 ± 0.0 ^c	10
11	0.25EO	0.50C	0.00 ± 0.0 ^c	11
Fixed concentrations	Sodium alginate (0.50%)	Bread Fruit Starch (2%)		

EO= Essential Oil ***Added to the layer as nanoedispersion; C= Chitosan; n=4

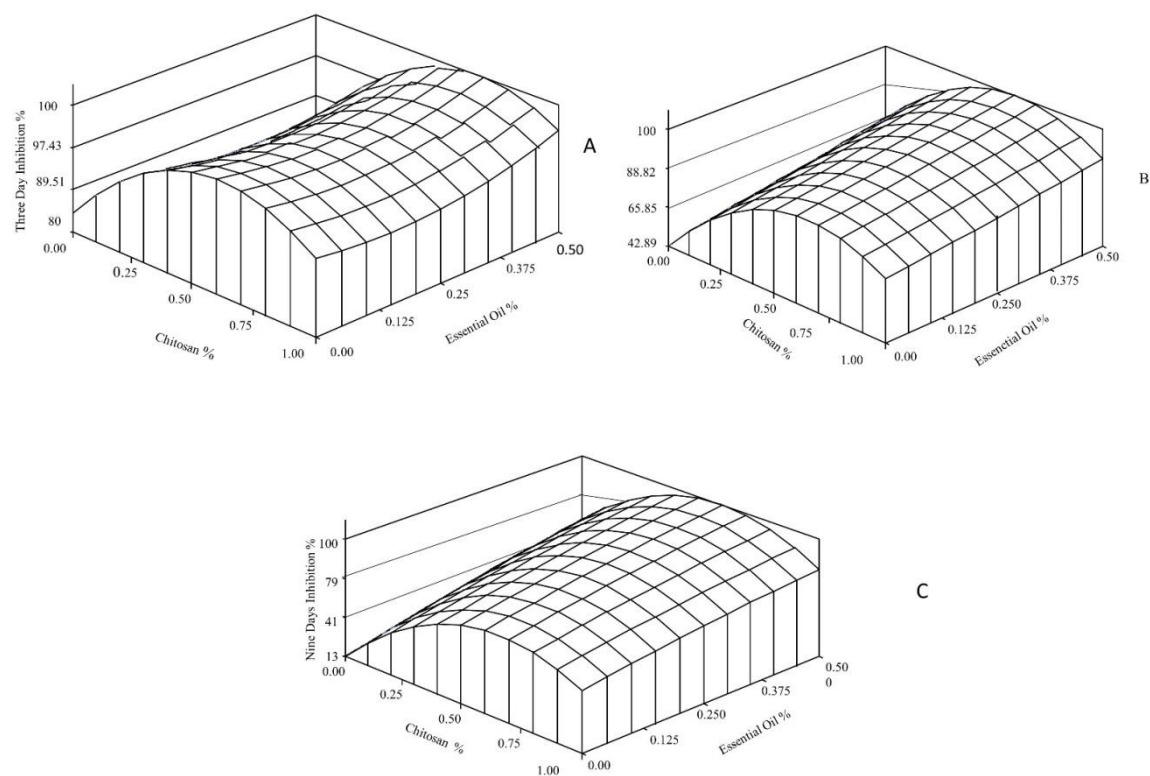


Figure 3. Inhibition (%) of growth of *C. gleosporioides* submitted to culture medium enriched with nanoemulsion of fennel essential oil in bilayer coatings, at three (A), six (B) and nine days (C) of incubation,

In combinations with different levels of nanoemulsion of fennel essential oil in the first layer and breadfruit starch (2%) and different levels of chitosan in the second layer *in vitro*

In order to expose the behavior of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, during an incubation period of nine days, submitted to a culture medium enriched with constituents used in the preparation of nanodispersion bilayer coatings, the fungus was not able to develop at certain concentrations of antifungals. During this period, it evidences that the associated use of chitosan, from concentrations at 0.5% and with nanodispersion elaborated with concentrations from 0.25% of fennel essential oil, were excellent antifungal agents (Figure 4). The fungus *C. gloeosporioides* was applied in PDA culture medium enriched with 2% bread fruit starch and sodium alginate (0.50%), which allowed the fungus to have favorable conditions for its development by presenting nutrients and physical conditions. chemicals that are indispensable for its growth through the absorption of nitrogenous substrates and carbon, through the repression of nitrogen metabolites (NMR) and catabolic repression of carbon (RCC) (Fernandez & Wilson, 2012; Fernandez et al., 2012).

On the first three days, the percentage of inhibition in all bilayer formulations was above 80%. During the incubation period, at six days, formulations with 0% percentages of chitosan began to show a decrease in their inhibition power (42.98%) and at nine days, they reached 13% inhibition. The performance is also explained, where the formulations of nanoparticulate bilayer coatings (02; 04; 06; 07; 08; 09; 10 and 11) had higher inhibition rates, with antifungal action around 100% until the end of the cycle. life of the fungus.

It is noteworthy that concentrations of 0.15% and 0.85% of chitosan associated with low concentrations of nanoparticles (0.07%) inhibited less efficiently, when compared to nanoparticulate bilayers, with percentages from 0.25 % essential oil; however, a coating that used only 0.5% chitosan (formulation 05) did not obtain satisfactory results against the inhibition of fungus growth during the incubation period. These nanoparticulates had an antifungal effect due to the presence of substances that act synergistically, especially the phenylpropanoid family, represented by several constituents, moreover, trans-Anethole is presented in higher concentrations (Senatore, et al 2013; Pavela et al., 2016; Kfoury et al., 2016).

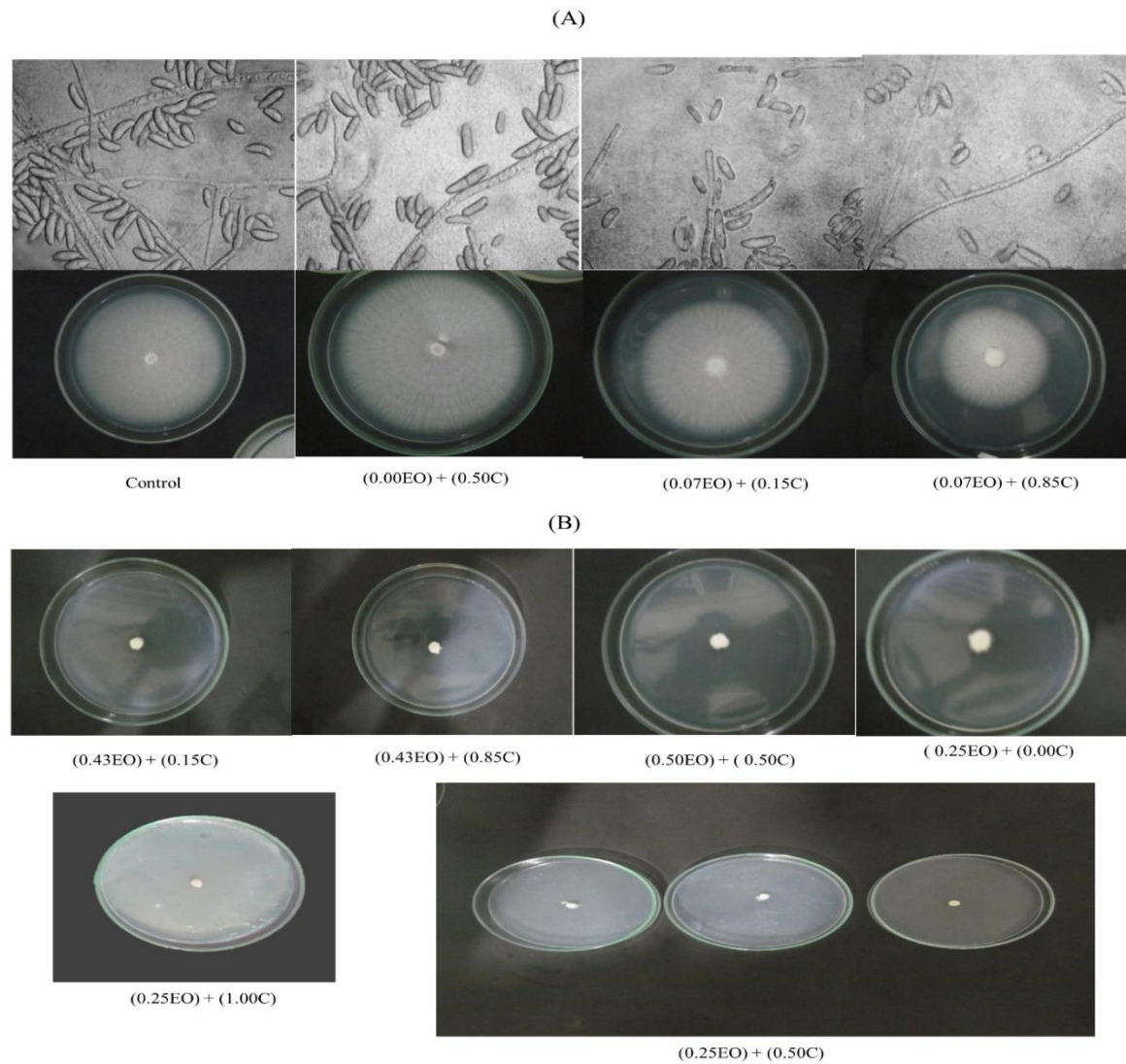


Figure 4. Growth of *C. gleosporioides* in Petri dishes in culture medium enriched with different formulations of bilayer coatings for 09 days storage under temperature $22\pm 2.0^{\circ}\text{C}$. (A) Formulations shown growth of *C. gleosporioides*. (B) Formulations in which the growth of *C. gleosporioides* was inhibited. $n=4$.

Figure 5 shows the principal component analysis (PCA) of nanoparticulate bilayer coatings, it was possible to form, according to the physical, chemical and microbiological parameters, two distinct groups related to such characteristics. The main component explains 72.05% of the variability of the data, CP1 was composed by the inhibition parameters at three, six and nine days, opacity and solubility, which presented a high correlation between them, being responsible for the explanation of 48% of the difference between the coatings.

CP2 was represented by permeability, and color parameters L, a, B and AE explaining 24.5% of the data variability. Group 1 was composed of nanoparticulate bilayers, of formulations 02, 04, 06, 07, 08, 09, 10 and 11 that will be united by presenting similar characteristics in terms of microbiological (inhibition period) and physical (solubility and opacity) parameters. When verifying these components, even showing differences in their composition regarding the formation of coverings, the formation of two groups was based on the greater proximity between them in relation to physical and microbiological characteristics. Group 2 was formed by proximity of results related to microbiological determinations, as to the result of IVCN and number of spores and physical parameters of color B and AE.

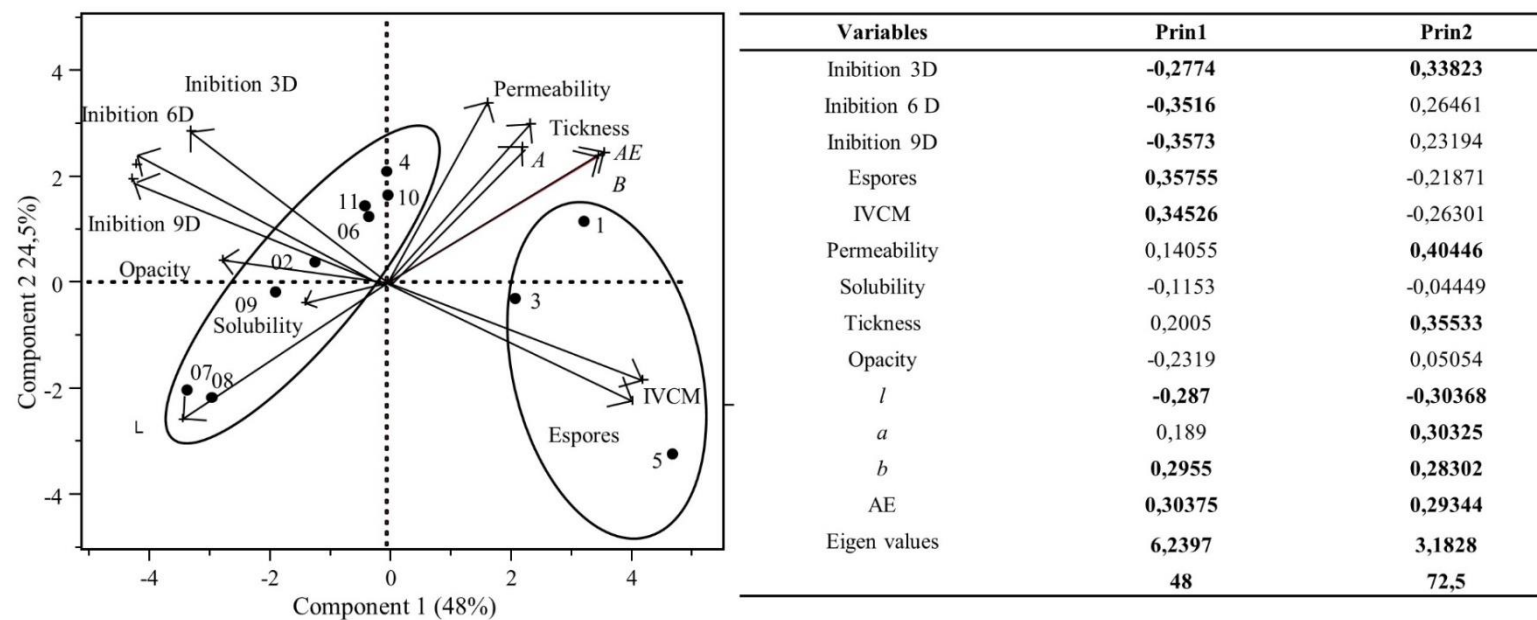


Figure 5. Dispersion of the physicochemical and microbial variables and formation of groups of the formulations based on the scores of the first and second principal components

The combination of biodegradable matrices used in this study, such as bread fruit starch, chitosan, alginate and essential oil, the latter as nanoparticulates, provided the production of biodegradable films with peculiar characteristics, which when united in the form of bilayers present quality in terms of physical and chemical conditions and microbiological. Thus, the four best formulations were evaluated, in terms of the results explained above, above all results related to microbiology. Of the two-layer coatings, the formulations that contained 0.50 and 0.85% chitosan and 0.25, 0.43 and 0.50% of fennel essential oil nanodispersion, with that, the formulations 04, 06, 07 and 09, were chosen, in order to better deepen their conformation, they were evaluated for FTIR, DRX and SEM.

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was performed in order to identify macromolecular formation of the bilayers obtained in the first layer: bread fruit starch, chitosan and second layer: alginate nanodispersion and anise essential oil (Figure 6). Based on the spectra presented, all nanodispersion bilayer coatings demonstrate similar behavior regarding bands in the range of 3,000 to 3,500 cm^{-1} , which may represent OH stretch and intra-hydrogen bonds (Vuddanda et al., 2017), the largest absorbance in the bilayer coating, which contained 2% starch plus 0.25% nanodispersion. The area between 750 and 1300 cm^{-1} is considered as the carbohydrate area in which specific bands can be detectable (Sen & Erboz, 2010). The region with the highest frequency is also called the region of functional groups, in which absorptions may occur that correspond to important functional groups, such as OH, NH, and C=O (Silverstein, Webster & Kiemle, 2012). When studying infrared spectra in bilayers composed of pectin, polyurethane and chitosan, applied to Tommy Atkins mango, Medeiros et al (2012) showed that bands of 1645 and 1560 cm^{-1} were evident for this type of material.

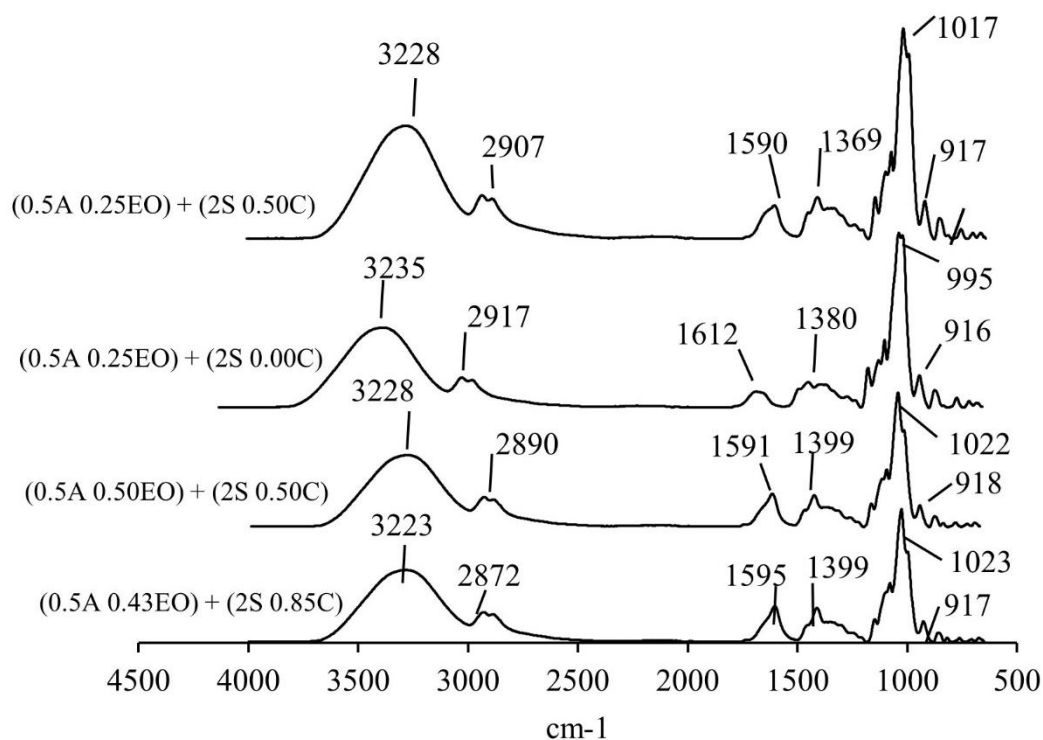


Figure 6. Absorption Spectrometry in the Fourier Transform Infrared (FTIR) region of bilayer coatings

When chemical groups interact at the molecular level, changes occur, in terms of width and intensity, which are observed in the FTIR spectra, which may favor miscibility (XU et al., 2007). Also according to Silverstein, Webster & Kiemle, (2012), aromatic and heteroromatic compounds appear with strong intensity in the region from 1600 to 1300 cm⁻¹, and in the region from 1300 to 900 cm⁻¹ it is known as fingerprint, which is of great importance to determine the structural conformation; noting that all characteristics observed in all bilayers were similar and when this type of result occurs, it can appear in practically identical spectra, however, it can still present small differences, regarding the expansion of the scale of intensities.

Figure 7 shows the X-ray diffractogram for nanoparticulate bilayers composed of polar and nonpolar substances. All diffractograms have peak numbers that vary at different angles, but which show characteristics of the presence of starch. They have a similar behavior, with peak intensity, but the bilayers that contain 2% starch, 0.50% chitosan and 0.25 and 0.50% nanoparticles, which presented high intensity and consequently greater crystallinity, are more prominent. of its components.

Also according to Campos et al., (2005), the greater the amount of fine peaks observed, the greater the structural organization and crystallinity of the material studied. Starch granule crystallinity can be characterized by X-Ray diffraction in patterns, determined by cereal starches, and

tuber and fruit starch, as a consequence of the double helix packing of the branched chains of this polymer. Furthermore, the greater the degree of crystallinity, the greater the mechanical strength of the material (Van Soest & Vliegenthart, 1997; Carmo & Paiva, 2015), a fact observed in these formulations. The presence of amorphous characteristics is present in the formulation that contains 2% starch, 0.85% chitosan and 0.43% nanodispersion. It is noticed that the peaks obtained at all scale is a possible dispersion of nanocrystals in the matrix, all these coatings showed high peaks between angles 2Θ ($^{\circ}$) = 15° (coatings 06 and 09) and 2Θ ($^{\circ}$) = 25° (04 and 07), the interaction of starch with alginate, chitosan made these matrices with crystalline characteristics, in addition to improving the dispersion of crystals by using a surfactant (Tween 40®). Other studies show that the behavior of crystalline components with an amorphous phase is characterized by the way the material is obtained and natural, since, when studying the effect of cellulose nanocrystals. The presence of high concentrations of amylopectin can lead to this conformation, since it is the main crystalline component of starch, its branching points form amorphous regions, its crystallinity varies around 15 to 45% (Van Soest & Vliegenthart, 1997) Fortunati et al (2014), indicate recrystallization of nanocomposers during the nucleation process and Pereira et al., (2014) indicate that the use of crystalline matter with amorphous characteristics leads to improvements in the barrier, thermal and mechanical properties of biodegradable films.

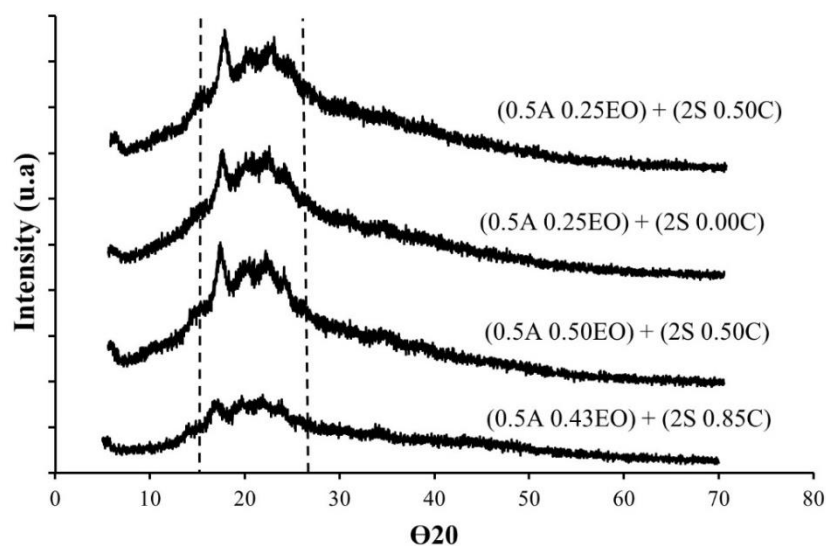


Figure 7. Crystallographic analysis by dispersive X-ray spectroscopy of the bilayer coatings

Figure 8 shows the captured images of the microstructures of the nanoparticulate bilayer coatings, the upper surfaces (second layer), lower surfaces (first layer) and cross section, respectively. It can be seen that the upper surfaces of the films showed different behaviors, as they present a surface with a differentiated color, caused by the high concentration of droplets of essential oil and chitosan, present in the formulations 04 (0.43%) 06 (0.5%) , 07 (0.25%) and 09 (0.25%). Homogeneous surfaces may be related to a better dispersion of oil droplets within the structure, associated with the presence of chitosan. This behavior may be related to the high amount of essential oil, which can give

the film surface greater thickness, when associated with alginate. However, another important fact is that the migration of oil droplets onto the films can cause greater volatilization, however, when presented in the form of nanoparticles, this matrix presents greater stability, as it maintains the lipid phase linked to the aqueous phase of the alginate solution. (Norajit, Kim & Ryu, 2010; Shojaee-Aliabadi et al., 2014; Sanchez-Gonzalez et al., 2011; Acevedo-Fani et al., 2015). On the lower surfaces, formed by 2% starch and percentages of chitosan 04 (0.85%), 06 (0.5%), 07 (0.0%) and 09 (0.5%), a heterogeneity regarding the conformation of the first layer, mainly in the 07 bilayer, which does not have chitosan in its formulation.

As for the thickness of the bilayers, variations were observed, which may be associated with the conformation of the matrix related to the concentrations of the major components present. In the 0.85: 0.43 chitosan and nanoemulsion bilayer, respectively, the C1 image, the first and second layers, correspond to thicknesses of 100µm and 14.9µm; formulation 06, (C2) 94.9 µm and 23.1 µm; formulation 07 (C3) 81.3µm and 32.1µm; 09 (C4) 52.0 µm and 35.7 µm. All bilayers did not show separation between the first and second layers, thus having a high interaction between them.

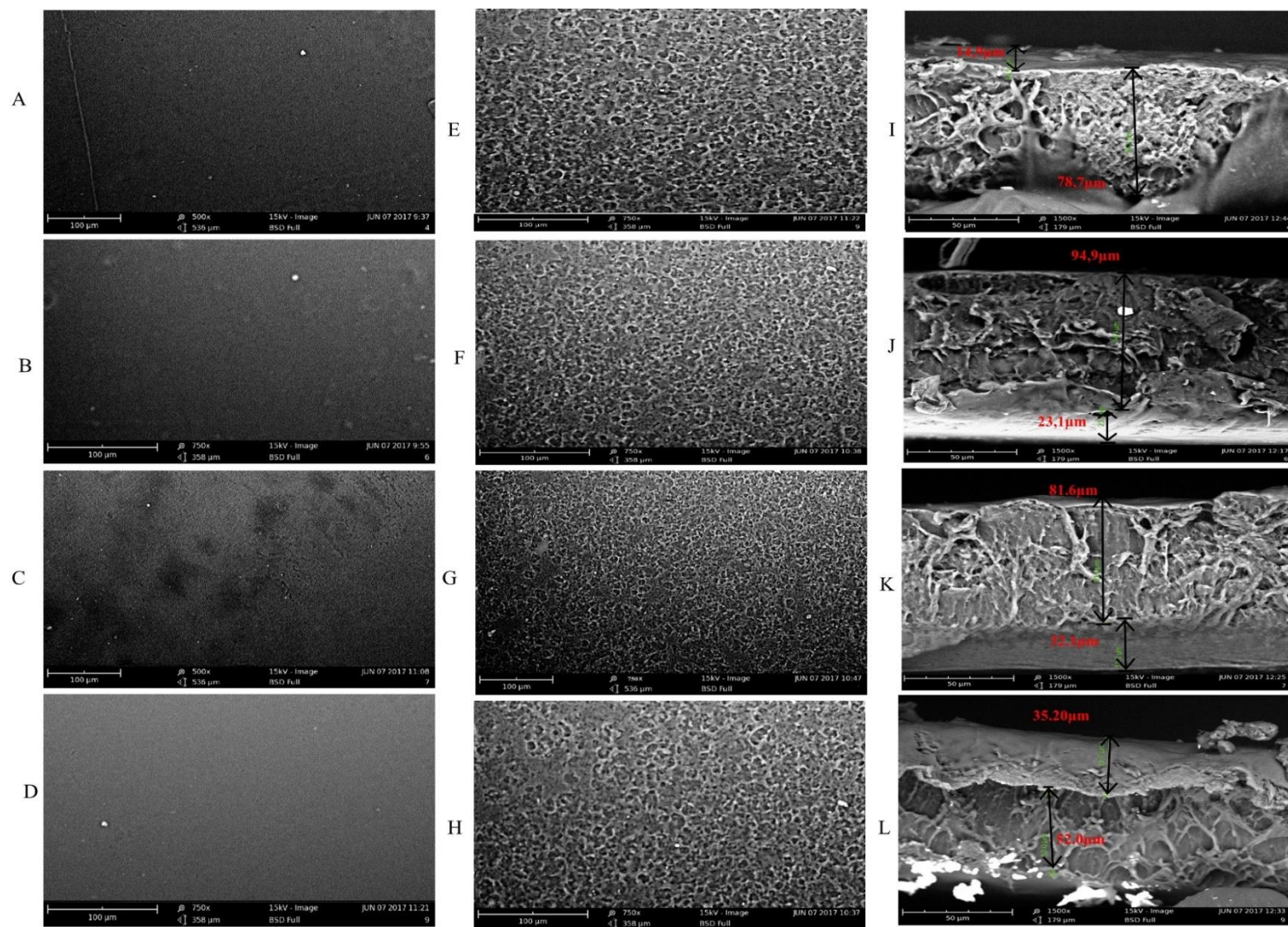


Figure 8. Scanning electron micrograph, with 750x magnification for first layer 0.5A 0.43EO (A); 0.5A 0.50EO (B); 0.5A 0.25EO (C) and 0.5A 0.25EO (D); second layer (2S 0.85C (E); 2S 0.50 (F); 2S 0.00C (G) and 2S 0.50C (H).) Cross section with 1500x magnification corresponding to bilayer coatings (0.5A 0.43EO) + (2S 0.85C) (0.5A 0.25EO) + (2S 0.50E) + (2S 0.50C) (J): (0.5A 0.25EO) + (2S, 0C) (K) and L).

4. Conclusions

The ripe bread fruit provides about 80% starch, of which 51% is amylose and 28% amylopectin, which have a maximum solubility index and swelling power at 80°C, being characterized as an appropriate quality base raw material for formulation of overlays.

The bilayer coatings, containing in the outermost layer an emulsion of fennel essential oil incorporated in a sodium alginate matrix and the inner layer of bread fruit starch combined with chitosan, produced films with adequate physical and chemical properties, with emphasis on the permeability parameters, opacity, thickness.

The microbiological analyzes showed that the incorporation of essential oil in the formulations was efficient in inhibiting the development of *C. gleosporioides*, mainly in the associated concentrations of fennel essential oil nanoemulsions of 0.25%, 0.43% and 0.5% associated of chitosan 0.5%, 0.85%. In the physical-chemical characterization of the films, these formulations showed crystalline and amorphous conformation. Therefore, these have appropriate attributes for coatings, aiming to extend the shelf life of fruits and vegetables.

5. References

- Abbas, S., Bashari, M., Akhtar, W., Li, W.W., Zhang, V. (2014). Process optimization of ultrasound-assisted curcumin nanoemulsions stabilized by OSA-modified starch. **Ultrasonics Sonochemistry**, 21, 1265–1274.
- Acevedo-Fani, A., Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. L., Martín-Belloso, O. (2015). Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. **Food Hydrocolloids**, 47, 168-177.
- Adebowale, K. O., Olu-Owolabi, B. I., Olawumia, E. K., Lawal, O. S. (2005). Functional properties of native, physically and chemically modified breadfruit (*Artocarpus artilis*) starch. **Industrial Crops and Products**, 21, 343–351.
- Alboofetile, M., Rezaei, M., Hosseini, H., Abdollahi, M. (2014). Antimicrobial activity of alginate/clay nanocomposite films enriched with essential oils against three common foodborne pathogens **Food Control**, 36, 1-7.
- Ali, A., Muhammad, M. T. M., Sijam, K., Siddiqui, Y. (2011). Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. **Food Chemistry**, 124, 620–626.
- Aquino, A. B., Blank, A. F., Santana, L. C. L. A. (2015). Impact of edible chitosan–cassava starch coatings enriched with *Lippia gracilis* Schauer genotype mixtures on the shelf life of guavas (*Psidium guajava* L.) during storage at room temperature. **Food Chemistry**, 171, 108–116.
- AOAC (2006). Official methods of analysis (18th ed.). Gaithersburg Association of **Official Analytical Chemists International**.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM. (2001). Standard test method for water vapor transmission rate through plastic film and sheeting using a modulated infrared sensor - **ASTM F1249 - 01**. Philadelphia: ASTM, 5p
- Avanço, G. B., Ferreira, F. D., Bomfim, N. F., Santos, P. A. S. R., Peralta, R. M., Brugnari, T., Mallmann, C. A., Abreu Filho, B. A., Mikcha, J. M. G., Machinski Jr. M. (2017). Curcuma longa L. essential oil composition, antioxidant effect, and effect on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production. **Food Control**, 73, 806-813.

628 Brasil, I. M., Gomes, C., Puerta-Gomez, A., Castell-Perez, M. E., Moreira, R. G. (2012).
629 Polysaccharide-based multilayered antimicrobial edible coating enhances quality of fresh-cut
630 papaya. **LWT - Food Science and Technology**, 47, 39-45

631 Carmo, K. P., Paiva, J. M. F. (2015). Filmes Biodegradáveis de Amido e Composições com
632 Outros Materiais. **Revista Virtual Quim**, 07, 2377-2386.

633 Cerqueira, M. A., Lo'pez, M. F. Rodri'guez, D. J. Vicente, A. (2016). Perspectives on
634 Utilization of Edible Coatings and Nano-laminate Coatings for Extension of Postharvest Storage
635 of Fruits and Vegetables. **Food Engenering**, 8, 292–305.

636 Cissé, M., Polidori, J., Montet, D., Loiseau, G., Ducamp-Collin, M. N. (2015). Preservation of
637 mango quality by using functional chitosanlactoperoxidase systems coatings **Postharvest**
638 **Biology and Technology**, 101, 10–14

639 Elsabee, M. Z., Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review.
640 **Materials Science and Engineering C**, 33, 1819–1841.

641 Fernandez, J., Wilson, R. A. (2012). Why No Feeding Frenzy? Mechanisms of Nutrient
642 Acquisition and Utilization During Infection by the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*.
643 **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 25, 1286–1293

644 Fernandez. J., Wright, J. D., Hartline, D., Quispe, C. F., Madayiputhiya, N., Wilson, R. A.
645 (2012) Principles of Carbon Catabolite Repression in the Rice Blast Fungus: Tps1, Nmr1-3, and
646 a MATE–Family Pump Regulate Glucose Metabolism during Infection. **Role of Carbon**
647 **Metabolism in Rice Blast Disease**, 08, 01-26

648 Fortunatia, E., Peltzer, M., Armentano, I., Torrea, L., Jiménez, A., Kennya, J. M. (2012).
649 Effects of modified cellulose nanocrystals on the barrier and migration properties of PLA nano-
650 biocomposites **Carbohydrate Polymers**, 90, 948– 956

651 Guerreiro, A. C., Gago, C. M. L., Faleiro, M. L., Miguela, M. C. G., Antunes, M. D. C.
652 (2015). The effect of alginate-based edible coatings enriched with essential oils constituents on
653 *Arbutus unedo* L. fresh fruit storage **Postharvest Biology and Technology**, 100, 226–233.

654 Guimarães, G. H. G., Dantas, R. L., Sousa, A. S. B., Soares, L. G., Melo, R. S., Silva, R. S.,
655 Lima, R. P., Mendonça, R. M. N., Beaudry, R. M., Silva, S. M. (2017). Impact of cassava
656 starch-alginate based coatings added with ascorbic acid and elicitor on quality and sensory
657 attributes during pineapple storage. **African Journal of Agricultural Research**, 12, 664-673.

658 Helander, I. M., Nurmiaho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., S. Roller, S. (2001)
 659 Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria
 660 **International Journal of Food Microbiology** 71, 235–244.

661 Hoover, R., Hughes a, T., Chung b, H. J., Liu, Q. (2010). Composition, molecular structure,
 662 properties, and modification of pulse starches: A review **Food Research International**, 43,
 663 399–413.

664 Jiang, T. (2013). Effect of alginate coating on physicochemical and sensory qualities of button
 665 mushrooms (*Agaricus bisporus*) under a high oxygen modified atmos **Postharvest Biology and**
 666 **Technology**, 76, 91–97.

667 Jridia, M., Hajjia, S., Ayeda, H. B., Lassoueda, I., Mbarek, A., Kammouna, M., Souissic, N.,
 668 NasrI, M. (2014). Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin–
 669 chitosan composite edible films **International Journal of Biological Macromolecules**, 67, 373–
 670 379.

671 Kfour, M., Sahraoui, A. L., Bourdon, N., Laruelle, F., Fontaine, J., Auezova, L., Greige-
 672 Gerges, H., Fourmentin, S. (2016). Solubility, photostability and antifungal activity of
 673 phenylpropanoids encapsulated in cyclodextrins. **Food Chemistry**, 196, 518–525.

674 Komaiko, J., McClements, D. J. (2015). Low-energy formation of edible nanoemulsions by
 675 spontaneous emulsification: Factors influencing particle size **Journal of Food Engineering**,
 676 146, 122–128.

677 Latchoumiaa, J. N., Adeneta, S., Aurore, G., Rocheforta, K., Buléon, A., Fährasmane, L.
 678 (2014). Composition and growth of seedless breadfruit *Artocarpus altilis* naturalized in the
 679 Caribbean. **Journal Scientia Horticulturae**, 175, 187–192.

680 B. Li, B., Kennedy, J. F., Peng, J. L., Yie, X., Xie. B. J. (2006). Preparation and performance
 681 evaluation of glucomannan–chitosan–nisin ternary antimicrobial blend film **Carbohydrate**
 682 **Polymers**, 65, 488–494.

683 Lawala, O. S., Adebawale K. O (2005). Physicochemical characteristics and thermal properties
 684 of chemically modified jack bean (*Canavalia ensiformis*) starch **Carbohydrate Polymers**, 60,
 685 331–341.

686 Madruga, M. S., Albuquerque, F. S. M., Silva, I. R. A., Amaral, D. B., Magnani, M., Queiroga
 687 Neto, V. (2014). Chemical, morphological and functional properties of Brazilian jackfruit
 688 (*Artocarpus heterophyllus* L.) seeds starch **Food Chemistry**, 143, 440–445

689 Maniglia, B. C., Delia, R. (2016). Tapioca-BL_acido Isolation and characterization of starch from
690 babassu mesocarp **Food Hydrocolloids**, 55, 47-55.

691 Mantilla, N., Castell-Perez, M. E., Gomes, C., Moreira, R. G. (2013). Multilayered
692 antimicrobial edible coating and its effect on quality and shelf-life of fresh-cut pineapple
693 (Ananas comosus). **LWT - Food Science and Technology**, 51, 37-43.

694 MARTINEZ, C. Y.; CUEVAS, F. (1989). **Evaluación de la calidad culinária y molinera del**
695 **arroz**. Guia del estudio. Cali: CIAT, 75 p.

696 Martiñon, M. E., Moreira, R. G., Castell-Perez, M. E., Gomes, C. (2014). Development of a
697 multilayered antimicrobial edible coating for shelflife extension of fresh-cut cantaloupe
698 (Cucumis melo L.) stored at 4 °C **LWT - Food Science and Technology**, 56, 341-350.

699 Medeiros, B. G. S., Pinheiro, A. C., Carneiro-da-Cunha, M. G., Vicente, A. A. (2012).
700 Development and characterization of a nanomultilayer coating of pectin and chitosan –
701 Evaluation of its gas barrier properties and application on ‘Tommy Atkins’ mangoes. **Journal**
702 **of Food Engineering**, 110, 457–464.

703 Nejadmansouri, M., Hosseini, S. M., H., Niakosari, M., Yousefi, G. H., Golmakani, M. T.
704 (2016). Physicochemical properties and storage stability of ultrasoundmediated WPI-stabilized
705 fish oil nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, 61, 801-811.

706 Norajit, K., Kim, K. M., Ryu, G. H. (2010). Comparative studies on the characterization and
707 antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. **Journal of**
708 **Food Engineering**, 98, 377–384.

709 Oliveira, C. E. V., Magnani, M., Sales, C. V., Pontes, A. L. S., Campos-Takaki, G. M.,
710 Stamford, T. C. M., Souza, E. L. (2014). Effects of chitosan from *Cunninghamella elegans* on
711 virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca* L.) **International**
712 **Journal of Food Microbiology**, 171, 54–61.

713 Pavela, R., Zabka, M., Bednář, J., Triska, J., Vrchotová, N. (2016). composition and
714 insecticidal activity of essential oils obtained from the aerial parts or seeds of fennel (*Foeniculum*
715 *vulgare* Mill.) **Industrial Crops and Products**, 83, 275–282.

716 Pereira, F. V., Paula, E. L., Mesquita, J. P., Lucas, A. A., Manod, V. (2014).
717 Bionanocompósitos preparados por incorporação de nanocristais de celulose em Polímeros

718 biodegradáveis por meio de evaporação de solvente, automontagem ou Eletrofiação, **Química**
719 **Nova**, 37, 1209-1219.

720 Sánchez-González, I., Chiralt, a., González-Martínez, C., Cháfer, M. (2011). Effect of essential
721 oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose
722 and chitosan **Journal of Food Engineering**, 105, 246–253.

723 Schoch, T. J.; Maywald, E. C. (1968). Preparation and properties of various legume starches.
724 **Cereal Chemistry**, v.45, p. 564-573.

725 Sen, M., Erboz, E. N. (2010). Determination of critical gelation conditions of j-carrageenan by
726 viscosimetric and FT-IR analyses. **Food Research International**, 43, 1361–1364.

727 Senatore, F., Oliviero, F., Scandolera, E., Taglialatela-Scafati, O., Roscigno, G., Zaccardelli,
728 M., Falco, E. (2013). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of
729 anethole-rich oil from leaves of selected varieties of fennel [*Foeniculum vulgare* Mill. ssp.
730 *vulgare* var. *azoricum* (Mill.) Thell. **Fitoterapia**, 90, 214–219.

731 Shojaee-Aliabadia, S., Hosseinia, H., Mohammadifara, M. A., Mohammadia, A., Ghasemlou,
732 M., Hosseinia, S. M., Khaksara, R. (2014). Characterization of α -carrageenan films incorporated
733 plant essential oils with improved antimicrobial activity **Carbohydrate Polymers**, 101, 582–
734 591.

735 Singh, G., Maurya, S., Lampasona M. P., Catalan, C. (2006). Chemical constituents, antifungal
736 and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract **Food**
737 **Control**, 17, 745–752.

738 Singh, N., Sandhu, K. S., Kaur, M. (2004). Characterization of starches separated from Indian
739 chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars **Journal of Food Engineering**, 63, 441–449.

740 Sipahi, R. E., Castell-Perez, M. E., Moreira, R. G., Gomes, C., Castillo, A. (2013). Improved
741 multilayered antimicrobial alginate-based edible coating extends the shelf life of fresh-cut
742 watermelon (*Citrullus lanatus*) LWT - **Food Science and Technology**, 51, 9-15.

743 Souza, R. C. R., Andrade, C. T. (2000). Investigação dos Processos de Gelatinização e
744 Extrusão de Amido de Milho. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 10, 24-30.

745 Soylu, S., Yigitbas, H., Soylu, E. M., Kurt, S. (2007). Antifungal effects of essential oils from
746 oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Applied Microbiology**, 103, 1021–
747 1030.

- 748 Treviño-Garzaa, M. Z., García, S., Heredia, N., Guadalupe, M., Arévalo-Niñoa, K. (2017).
 749 Layer-by-layer edible coatings based on mucilages, pullulan and chitosan and its effect on
 750 quality and preservation of fresh-cut pineapple (*Ananas comosus*) **Postharvest Biology and**
 751 **Technology**, 128, 63–75.
- 752 Van Soest. J. J. G.; Vliegenthart, J. F. G. (1997). Crystallinity in starch plastics: consequences
 753 for material properties. **TIBTECH**, v. 15, p. 208 – 2013.
- 754 Vuddanda, P. R., Montenegro-Nicolini, M., Morales, J. O., Velaga, M. (2017). Effect of
 755 plasticizers on the physico-mechanical properties of pullulan based pharmaceutical oral films
 756 **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 96, 290–298
- 757 Ying-Chien, C., Yu, C. (2008). Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble
 758 chitosan. **Bioresource Technology**, 99, 2806–2814.
- 759 Zambrano-Zaragoza, M. L., Gutiérrez-Cortez, E., Real, A. D., González-Reza, R. M.,
 760 Galindo-Pérez, M. J., Guerrero, A. Q. (2014). Fresh-cut Red Delicious apples coating using
 761 tocopherol/mucilage nanoemulsion: Effect of coating on polyphenol oxidase and pectin
 762 methylesterase activities. *Food Research International*, 62, 974–983.
- 763 Zhou, Y., Zhang, L., Zeng, K. (2016). Efficacy of *Pichia membranaefaciens* combined with
 764 chitosan against *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits and possible modes of action.
 765 *Biological Control*, 96, 39–47.

Recobrimento em bicamadas a base de amido de fruta pão e nanoemulsão de óleo essencial de erva doce sobre o potencial funcional do mamão ‘Golden’

Bilayers coatings based on breadfruit starch and fennel essential oil nanoemulsion on the functional potential of ‘Golden’ papaya

Resumo: Mamões são frutos amplamente comercializados e consumidos no mundo inteiro, mas são extremamente sensíveis ao etileno, apresentando elevada taxa respiratória, susceptibilidade à podridões e, portanto, curta vida útil pós colheita. Assim, o desenvolvimento de tecnologias inovadoras sustentáveis para a redução da taxa metabólica destes frutos na pós-colheita e controle do desenvolvimento de podridões é fundamental na sua cadeia produtiva. Neste sentido, recobrimentos biodegradáveis a base de matérias primas regionais, adicionados de óleos essenciais, podem ser uma alternativa para a conservação pós-colheita. No entanto, a utilização de óleos essenciais diretamente em contato com a casca dos frutos, pode acarretar desordens fisiológicas irreversíveis e consequentemente comprometimento da qualidade e redução vida útil pós-colheita. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de bicamadas obtidas por polissacarídeos e óleo essencial de erva doce que mantenham a qualidade dos frutos, sem modificar o metabolismo e aspectos funcionais e microbiológicos, durante armazenamento em temperatura ambiente. Planejamento experimental foi aplicado para escolha da melhor formulação quanto aos aspectos microbiológicos, que continham percentuais fixos de amido de fruta pão (AFP) e alginato de sódio (AS) e percentuais variáveis de quitosana (Q) e óleo essencial de erva doce (OE). Com isso, foram aplicadas nos frutos a primeira camada com AFP e Q e pós secagem dos frutos foi aplicada a segunda camada composta por nanoparticulados de OE com AS. Recobrimento em bicamada permitiu retardar a maturação de mamão Golden e, consequentemente, o manter seu potencial funcional, principalmente em frutos recobertos com a bicamada composta de 0.50% de nanoparticulados e AS (cada) e 2% de AFP com 0.50% de Q.

Palavras – chave: *Carica papaya* L, *C. gleosporioides*, Bioativos, Atividade Enzimática, aceitação sensorial e Taxa Respiratória

1.Introdução

Frutos que apresentam elevada atividade metabólica, consequentemente, demandam maiores cuidados durante manejo e sua vida pós colheita. Representante desta categoria, o mamão da variedade Golden, é um fruto com elevada aceitação, por apresentar características sensoriais (cor, sabor, odor e textura) apreciáveis ao consumidor (Ruggiero et al, 2011). No entanto, quando colhido fisiologicamente maduro, passa por rápidas e profundas mudanças, durante fase de amadurecimento pela ação do etileno, que desencadeia uma gama de transformações nos frutos, resultando assim em mudanças na coloração da casca, na firmeza, na cor e no sabor da polpa (Li et al., 2013).

Perdas pós-colheita causadas por patógenos fúngicos no mundo têm aumentado constantemente na produção de mamão (Bautista-Baños et al., 2013; Liu et al., 2017; Valenzuela et al., 2015), limitando a sua vida útil pela ação da antracnose causada pelo *Colletotrichum gloeosporioides* (Ayón-Reyna et al., 2017; Madani et al., 2014). A utilização de fungicidas sintéticos são os mais utilizados no controle deste tipo de doença pós-colheita, mas

há relatos de que estes produtos apresentam efeito ineficiente, favorecendo o desenvolvimento de fitopatogenos mais resistentes, além ser nocivos à saúde humana (Choudhary et al., 2015). Nesta perspectiva, há uma tendência mundial em se utilizar menos fungicidas sintéticos (Romanazzi et al., 2017; Sisquella et al., 2014).

Recobrimentos biodegradáveis, que contenham em sua composição ingredientes ativos, são considerados alternativa viável para prolongar a vida útil pós colheita de frutos e vegetais frescos. Esta ação, está relacionado ao mecanismo de barreira protetora, que reduz processos metabólicos, a fim de reduzir taxas de respiração e transpiração, evitando assim rápida senescência (Antunes et al., 2012; Dhall, 2013; Valencia-Chamorro et al., 2013), pelo uso de fontes renováveis de polissacarídeos e óleos essenciais (Chen et al., 2016; Gardesh et al., 2016; Khaliq et al., 2015; Suseno et al., 2014; Synowiec et al., 2014; Shojaee-Aliabadi et al., 2013). Além de agir, como antifúngicos, inibindo o desenvolvimento microbiológico de doenças pós colheita em frutos (Zúniga et al., 2012).

O amido oriundo de matérias primas de mandioca, batata e milho é um dos polissacarídeos mais importantes utilizados para desenvolver filmes biodegradáveis, quando comparado a filme não amiláceos, devido ao seu potencial para formar matriz continua, de baixa permeabilidade, incolor e de baixo custo (Gupta et al., 2014; Jiménez et al., 2012). Há outras alternativas na natureza ainda não exploradas, como a fruta pão (*Artocarpus altilis*), que é uma rica fonte de amido, com teores elevados de amilose (Nwokocha and Williams, 2011). Os óleos essenciais apresentam potencial ativo, com propriedades antifúngicas, inibindo a esporulação de microrganismos (Tan et al., 2015), sendo largamente utilizada na elaboração de recobrimentos/filmes, que apresenta baixa permeabilidade ao O₂, biocompatibilidade e atóxico (Bonilla et al., 2013), utilizados no combate ao *Aspergillus niger* (Perdones et al., 2014) e *Fusarium verticillioides* (Roselló et al., 2015) (Kanatt et al., 2012; Bonilla et al., 2014).

No entanto, a ação dos óleos essenciais sobre a superfície dos frutos, pode ocasionar lesões irreversíveis, pela ação de suas substâncias antifúngicas. Com isso, a forma de disponibilizar, bem como, aplicar tais agentes ativos em frutos, é uma alternativa inovadora, elaborada através da nanotecnologia, que advém para formar soluções estáveis nanoparticuladas de óleo em água (O/A) (Salvia-Trujillo et al., 2013), melhorando a atividade biológica, com elevada atividade antibacteriana (Liang et al., 2012; Donsì et al., 2014; Kim et al., 2014; Severino et al., 2015; Bhargava et al., 2015). Aliado a esta tecnologia, a forma de aplicar em frutos recobrimentos e filmes, também apresenta efeito significativo na preservação da qualidade, durante vida pós colheita dos frutos. A aplicação por bicamadas é uma abordagem baseada na deposição alternativa de recobrimentos, com propriedades polieletrólitos de cargas opostas (Poverenov et al., 2014). Geralmente mais de duas camadas de recobrimentos, são adicionadas aos frutos, a fim de unir física e quimicamente, através da imersão em soluções filmogênicas distintas (Soliva – Fortuny, 2010; Skurtys et al., 2010).

Esta é uma alternativa viável para aplicação de finas camadas em frutos que apresentam elevadas perdas pós colheita, além de, produzir camadas que não modifiquem a aparência dos frutos, preservando a funcionalidade das matérias primas biodegradáveis, empregadas em sua formulação. Embora seja uma opção, não existem estudos voltados para aplicação de multicamadas compostas por amido de fruta pão, quitosana, e óleos essenciais nanoparticulados em frutos íntegros, sobretudo em mamão. Com isso o objetivo deste trabalho, foi aplicar recobrimentos bicamadas a base de amido de fruta pão, quitosana e nanoparticuladas de alginato de sódio e óleo essencial de erva doce em mamão Golden, com intuito avaliar o metabolismo e aspectos funcionais e microbiológicos, durante armazenamento em temperatura ambiente.

2.Material e Métodos

2.1. Material

Frutos de mamoeiro da variedade Golden, foram adquiridos no comércio atacadista de Campina Grande/PB, mais precisamente na Empresa Paraibana de abastecimento e Serviços Agrícolas (EMPASA), com estágio de maturidade grau 2 (25% de coloração amarela e 75% de coloração verde). Os frutos foram acondicionados de modo a não provocar injúrias, em caixas plásticas previamente higienizadas e transportados para o Laboratório de Biologia e Tecnologia Pós – Colheita da Universidade Federal da Paraíba, Campus II/Areia. Os demais ingredientes para avaliação da qualidade dos frutos durante armazenamento. Alginato de sódio (Dinamica), quitosana (Polymar) e óleo essencial de erva doce (Ferquima), foram obtidos comercialmente e utilizados para elaboração das bicamadas.

2.2. Preparo dos Frutos

Os frutos foram pré-selecionados e utilizados os que não apresentavam injúrias e doenças pós colheita (antracnose), logo em seguida, submetidos a sanitização com hipoclorito a 200ppm durante 15 minutos e deixados dispostos em cima de bancada previamente sanitizadas, para secagem em temperatura de $20\pm 2,0^{\circ}\text{C}$.

2.3. Bicamadas em Frutos e Armazenamento

As melhores bicamadas foram escolhidas, e aplicadas em frutos de mamão Golden, através de um experimento, utilizando delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial de 5×7 , que consistia em cinco tratamentos, incluindo o controle (sem aplicação de multicamadas nanopartilados) avaliados em sete períodos de 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias consecutivos, com três repetições para cada tratamento; para serem avaliados o metabolismo dos frutos, durante armazenamento.

A elaboração (processo) e obtenção (bicamdas) da melhor formulação obtida neste estudo, quanto aos efeitos na manutenção da qualidade, referente aos resultados de controle antifúngico, teor de ácido ascórbico e sólidos solúveis em frutos, está resguardada pela submissão de patente de número do pedido: BR102017022068-0, com protocolo: 870170078008.

24. Bioativos e Atividade Antioxidante

Para a determinação de ácido ascórbico ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), foram pesados 1g de polpa da polpa, que foi diluída em 50mL de ácido oxálico 0.50%, e utilizados para titulação com 2,6-dicloro-fenol- indofenol 0.002% (Strohecker and Henning, 1967). Para o licopeno e β - caroteno 1g de polpa da polpa foi macerado manualmente, com auxílio de areia calcinada durante 2 minutos, com 5mL solvente extrator, elaborado com 2:3 de acetona + hexano. Após a maceração, o volume do extrato foi completado para 10mL e armazenado em tubos Falcon de 15mL e centrifugados a $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$ por 9.000 rpm, para posterior leitura em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 505nm e 453nm, respectivamente (Nagata e Yamashita, 1992).

Para determinar flavonoides amarelos ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), a alíquota utilizada foi de 7g de polpa fresca, pesadas em tubos Falcon, para extração com solventes orgânicos etanol 95% + HCl 1,5 mol.L⁻¹ (85:15), por minutos em agitador de tubos e manteve-se reservada por 12 horas ao abrigo da luz e sob refrigeração (overnight) e lidos em comprimento de onda a 374nm (Francis, 1982).

Para determinar polifenóis extraíveis totais ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) e a atividade antioxidante, dos frutos foram pesados três gramas de polpa, em tubos de Falcon de 15mL, adicionados 4mL de solução extratora de metanol a 50%, agitados por 1 minuto e mantidos em repouso ao abrigo da luz por 60 minutos. Após este período, o extrato foi centrifugado a 15.000rpm por durante 15 minutos; o sobrenadante foi reservado em refrigeração a 4°C e o resíduo proveniente deste primeiro processo, foi ressuspenso em 4mL de solução extratora de acetona a 70%, seguido as mesmas condições citadas acima. Os dois extratos foram combinados, e o volume final ajustado para 10mL com água destilada. Os polifenóis extraíveis foram determinados por espectrofotometria, utilizando Folin-Ciocalteu (Dantas et al., 2015). O qual, foi tomada uma alíquota do extrato de 350 μL , a qual foi adicionado 150 μL de água destilada. Para leitura foi utilizado comprimento de onda de 700nm. O teor estimado de compostos fenólicos foi obtido utilizando-se uma curva padrão de ácido gálico ($R = 0,9986$).

Foram utilizados dois radicais livres DDPH: 1,1'-diphenil-2-picrilhidrazil (g de polpa/ g DPPH) e o ABTS (μM de Trolox. g de polpa⁻¹) para atividade Antioxidante, determinado mediante sequestro do radical livre, a partir do extrato dos polifenóis, que foram preparadas as

diluições de 400, 600 e 800 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, das quais retirou-se alíquota de 100 μL e adicionados em 3,9mL do radical DPPH (0,06 mM) e lidos no comprimento de onda a 515nm, e calculados efetuados em equação da reta com $R= 0,9938$ (Brand-Wiliams et al., 1995). Já para o sequestro do radical ABTS, foi utilizado solução de ABTS, elaborada com 5ml da solução de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ com concentração de 7mM, e 88 μL da solução de persulfato de potássio a 140mM, foi utilizado, para determinação diluição com etanol, até absorbância de $0,700\pm 0,05$, medido a 734nm. A partir dos extratos fenólicos, foram preparadas três diluições de 10, 20 e 30 mg.mL^{-1} e lidos em comprimento de onda a 734 nm. Os resultados foram calculados em curva padrão com $R = 0,9977$ (Dantas et al., 2015).

2.5. Atividade Enzimática

Para determinação das enzimas, foram preparados extratos com 2g de polpa fresca, macerados com 5mL de solução tampão fosfato 75mM pH 7,0. Para determinação de ascorbato peroxidase (APX), foi utilizado mistura contendo 1000 μL de tampão fosfato 75mM, p H 7,0 mais 40 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), 360 μL de solução de ácido ascórbico a 0,3mM e diluição dos extratos 0,33 μL (extrato) + 0,67 μL de tampão extrator e (Nakano and Assada, 1981). Absorbância lida em espectrofotômetro a 290nm. Para a Catalase (CAT), foi necessário o uso de 100 μL de extrato, 1000 μL de tampão fosfato de potássio 100mM, pH 7,8 e 400 μL de peróxido de hidrogênio a 50 mM. Absorbância lida em espectrofotômetro a 240nm (Blume e McClure, 1980). O superóxido dismutase (SOD), foi utilizado tampão fosfato de sódio pH 7,8, solução de trabalho riboflavina 10mM e solução de NBT 750mM aos extratos e lidos a um comprimento de onda de 560nm. Todos os resultados foram expressos em unidade de enzima por grama de amostra fresca (U/g AF).

As concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), foram determinadas de acordo com Velikova et al. (2000). Três gramas da polpa congelada foram homogeneizados em um banho de gelo com 5mL de solução de ácido tricloroacético 0,1% (W/V), homogeneizado e centrifugado a 14000 rpm por 20 min a 4°C e adicionado 3,0mL de tampão fosfato de potássio 5mM (pH 7,0) e 1mL de iodeto de potássio 1M. A absorvência foi medida a 390nm, usando um espectrofotômetro e a concentração de peróxido de hidrogênio foi expressa como mmol g^{-1} massa fresca.

2.6 Avaliação Microbiológica

Foram recobertos com a bicamadas, oriundas de planejamento experimental de 2^2 , com 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios, que continham como variáveis independentes o percentual de quitosana (0% a 1%) e óleo essencial de erva doce (0% a 0,5%) e como componentes fixos o amido de fruta pão (2%), alginato de sódio,

Tween 40® e glicerol (0,50% cada). Como variável dependente foi utilizada as melhores formulações que protegeram os frutos, contra o ataque do *C. gloeosporioides* (Tabela 1). Para isso cada fruto foi recoberto com as bicamadas, e submetidos a injúria com o auxílio de agulhas (autoclavadas), e inoculados discos de 4mm de diâmetro de meio de cultura com fungo. Logo em seguida, os frutos foram submetidos, a câmara úmida (frutos armazenados em ambiente com percentual de umidade relativa (UR) de 82%, a fim de provocar estresse no fruto, facilitando assim o ataque do fungo. Medições diárias, durante seis dias, foram realizadas, a fim de avaliar a severidade do *C. gloeosporioides*, nos frutos.

2.7. Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F ($p \leq 0,05$). Para a fonte de variação período de armazenamento (dias), aplicou-se análise de regressão polinomial até segundo grau; para avaliações de qualidade e análise sensoriais e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3. Resultados

3.1 Bioativos e Atividade Antioxidante

Alguns dos parâmetros de qualidade em frutos estão relacionada também a presença de compostos funcionais, como, os compostos bioativos. Os teores destes principais compostos encontrados em mamão estão explicitados neste estudo (Fig. 5). O teor de ácido ascórbico (Fig. 1 A), com decorrer do período de armazenamento foi crescente, para todos as bicamadas, incluindo a formulação controle. Dentre tais em ordem decrescente, o controle obteve valor médio de 82.73 mg.100g⁻¹, seguido dos frutos com bicamadas: 77,89 mg.100g⁻¹ (0.25EO: 0.00C), 71.56 mg.100g⁻¹ (0.43EO: 0.85C), 69,32 mg.100g⁻¹ (0.25EO: 0.50C) e 69,06 mg.100g⁻¹ (0.50EO: 0.50C). Este comportamento, está relacionado aos diferentes graus de amadurecimento dos frutos, reflexo da taxa de respiração, contida pelas bicamadas. Os teores dos flavonoides (Fig.1 B), seguiu o mesmo comportamento, em que maiores concentrações estavam dispostas em frutos controle (1.282,71 mg.100g⁻¹) e frutos com bicamada sem quitosana (1.292,71 mg.100g⁻¹) e menor concentração em frutos com bicamada com presença de 0.50% de nanoparticulados e quitosana (1.121,86 mg.100g⁻¹).

Os pigmentos encontrados neste estudo, demonstraram comportamento distinto, no decorrer do período de armazenamento, quando comparados ao ácido ascórbico e os flavonoides. Os níveis de licopeno em todas as formulações aplicadas, apresentou decréscimo,

no estado avançado de amadurecimento (senescência) dos frutos, com exceção da bicamada 0.50EO: 0.50C, que apresenta um leve acréscimo em seu conteúdo ao final do período de armazenamento, por não apresentar totalidade em sua maturidade fisiológica. O conteúdo deste fitoquímico (Fig. 1 C), apresenta elevadas concentrações entre os dias 6 e 8 de armazenamento para as bicamadas 0.43EO: 0.85C; 0.25EO: 0.50C; 0.25EO: 0.00C e o controle. Este comportamento, também é apresentado nos resultados relacionados a concentração do carotenoide β - caroteno (Fig. 1 D). Em ambos os pigmentos, a bicamada 0.50EO: 0.50C, manteve-se constante o aumento das concentrações destes bioativos. Enquanto que, houve decréscimo dos demais frutos, onde, as concentrações de 0.00%, 0.50%, 0.85% e 0.25%, 0.43% de dos componentes biodegradáveis, sobretudo, dos antifúngicos quitosana e nanoemulsão de óleo essencial de erva doce, respectivamente, não mantiveram a conservação destes constituintes ao final do período de armazenamento, tornando – os susceptíveis a despigmentação, por processo oxidativo.

Os polifenóis estão entre os principais compostos bioativos que atuam como antioxidantes em células instáveis (radicais livres), passando-as a células estáveis que não tenha ação nociva ao organismo humano. Com isso, sua determinação é essencial na avaliação da atividade antioxidante. Neste sentido, os polifenóis extraíveis totais foram determinados na polpa de mamão (Fig. 1 A), observando-se uma crescente elevação nos seus níveis no decorrer do armazenamento dos frutos. No presente estudo, houve efeito significativo ($p < 0,05$), para todas as bicamadas, com destaque para a com 0.50EO: 0.50C e para 0.43EO: 0.85C e 0.25EO: 0.50C que apresentaram teores de PET inferiores aos dos frutos do controle $63,57 \pm 0.85 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, $62,24 \pm 0.48 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, $58,82 \pm 0.97 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ e $76,45 \pm 1,04 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, respectivamente.

Mais uma vez, a aplicação das bicamadas que continham a presença dos dois antifúngicos, tiveram efeito direto no conteúdo bioquímico dos frutos. Sobretudo, quando se associa este, a atividade antioxidante, utilizando dois radicais livres: DPPH (Fig 6B) e o ABTS (Fig. 2 C) em que, esta atividade obteve resultados coerentes, no que diz respeito as concentrações dos polifenóis. Onde houve maiores teores destes constituintes, houve maior consumo dos radicais. Mais, em relação a atividade antioxidante DPPH EC_{50} , as bicamadas apresentaram maior capacidade antioxidante, deste radical, quando comparado ao controle, principalmente as bicamadas 0.50EO: 0.50C e 0.25EO: 0.50C, que apresentam concentrações próximas de nanoparticulados, quitosana, e mantiveram –se sempre com excelente atividade antioxidante de sequestro do radical, durante todo o período de armazenamento.

A atividade antioxidante do radical ABTS, apresentou comportamento distinto entre as formulações, durante todo período de armazenamento dos frutos. Inclusive das bicamadas, que

249 oscilaram atividade antioxidante elevada para os frutos que continham 0.43EO: 0.85C, 0.25EO:
250 0.50C e 0.25EO: 0.00C, durante os dias 02, 04, 06 e 08, e ao final do experimento os frutos
251 controle e bicamada 0.50EO: 0.50C, apresentam maior atividade antioxidante para este radical.
252 Estas discrepâncias entre os resultados, dos extratos obtidos dos frutos durante todo período de
253 armazenamento, é fator preponderante ao perfil do fitoquímico presente no extrato, bem como,
254 sua afinidade com radical e ação sinérgica entre os bioativos.

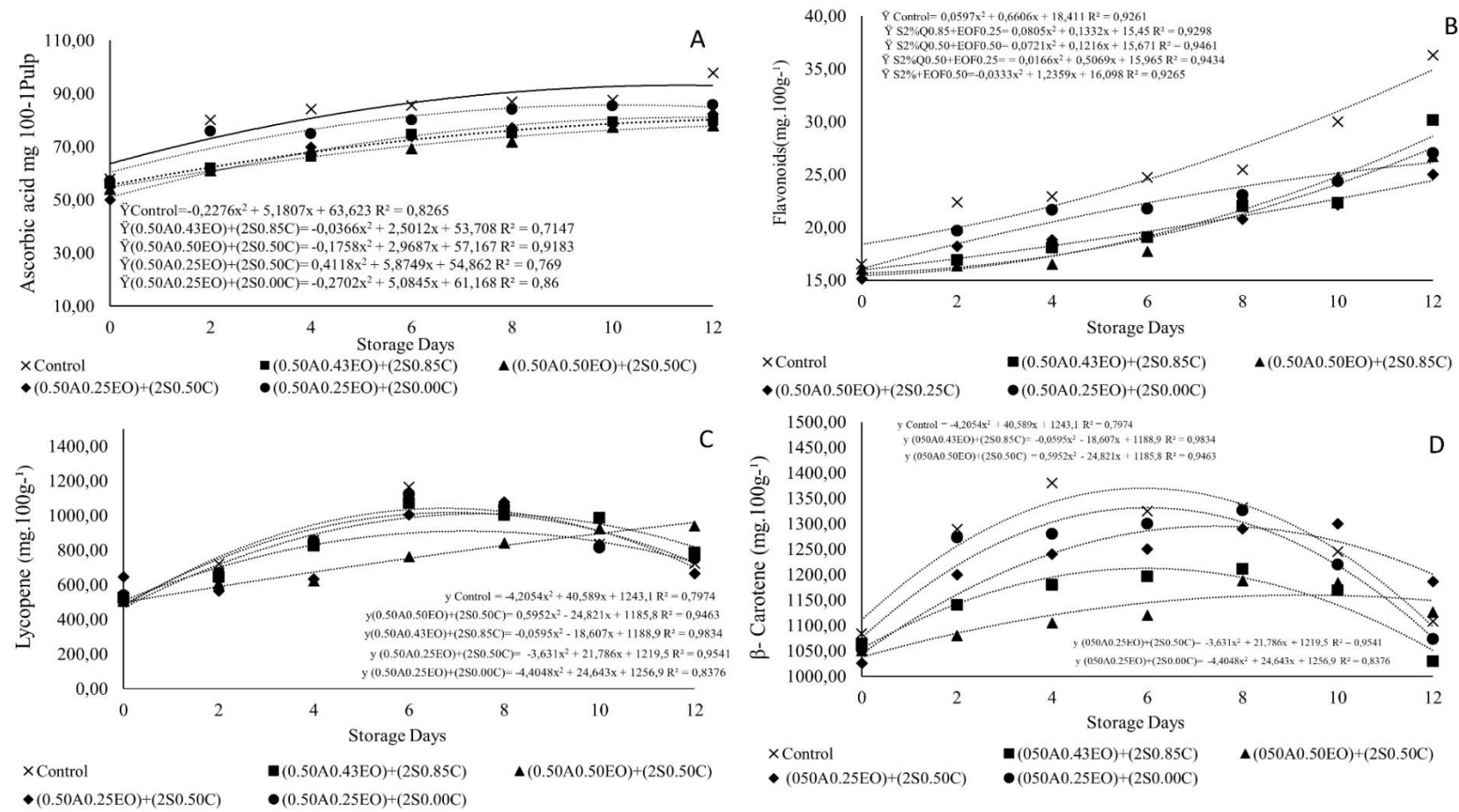


Figure 1. Ascorbic acid (A), yellow flavonoids (B), lycopene (C) and β-carotene (D) in Golden papaya coated with a bilayer composed of combinations of sodium alginate 0.5% (A) added of different levels of nanoemulsion of fennel essential oil (EO) in the first layer plus breadfruit starch 2% (S) added of different levels of quitosna (C) in the second layer, and the control (without coatings), during storage at room conditions (24 ±2.0 °C and 75 ± 3% RH) during 12 days.

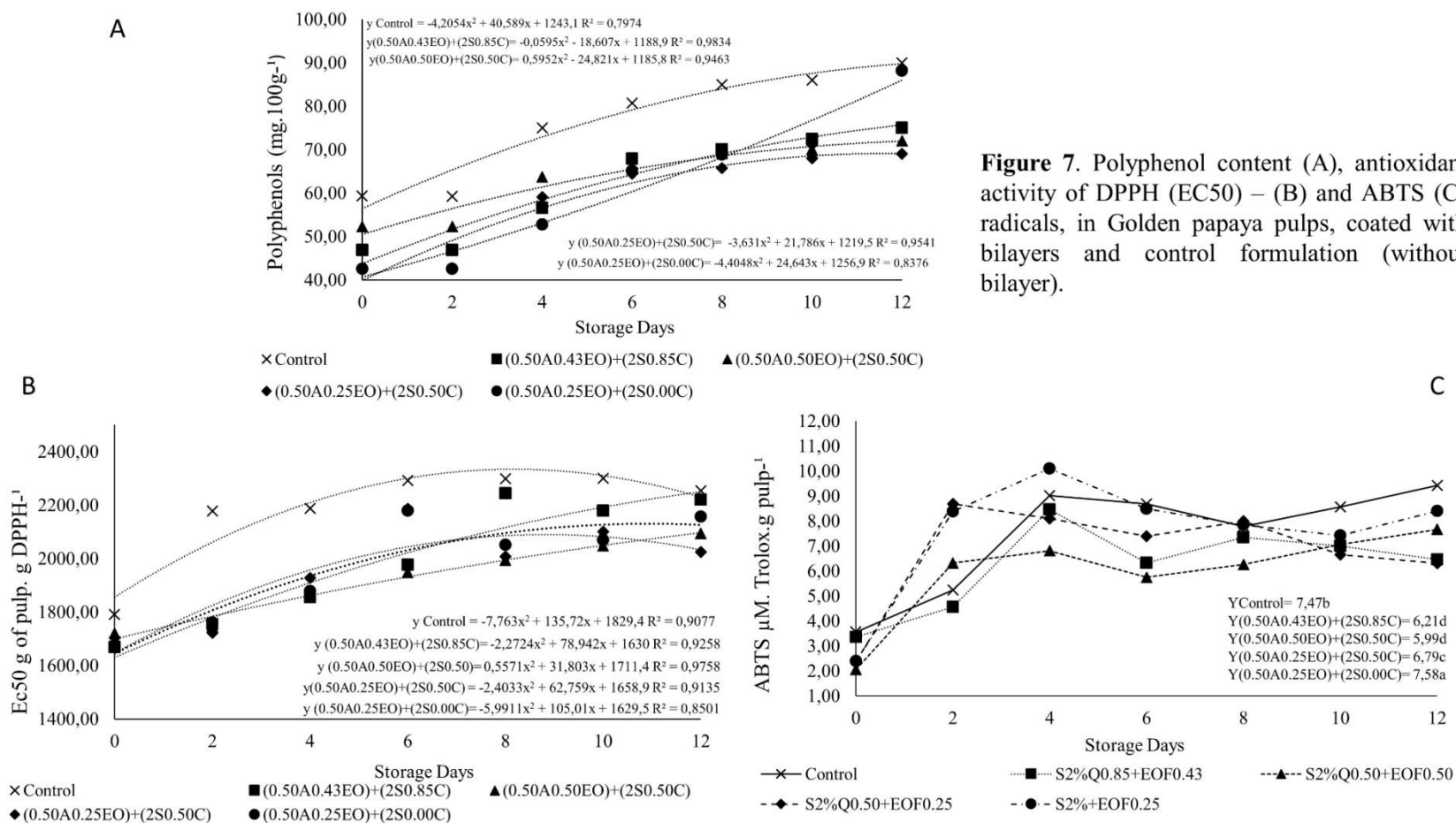


Figure 7. Polyphenol content (A), antioxidant activity of DPPH (EC50) – (B) and ABTS (C) radicals, in Golden papaya pulps, coated with bilayers and control formulation (without bilayer).

Figure 2. Total Extractable Polyphenol (A) and antioxidant activity by DPPH⁻¹ (EC50) (B) e by ABTS (C) radicals in Golden papaya coated with a bilayer composed of combinations of sodium alginate 0.5% (A) added of different levels of nanoemulsion of fennel essential oil (EO) in the first layer plus breadfruit starch 2% (S) added of different levels of quitosna (C) in the second layer, and the control (without coatings), during storage at room conditions (24 ±2.0 °C and 75 ± 3% RH) during 12 days.

266 3.2 Atividade Enzimática

267 A atividade enzimática e os níveis de peróxidos extraídos (Fig.3) na polpa de mamões
268 recobertos com bicamadas e frutos controle, demonstra mudanças nos perfis de acordo com o
269 grau de maturidade dos frutos, durante armazenamento.

270 Os níveis de peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) foram elevados nos frutos controle, quando
271 comparado aos frutos recobertos com as bicamadas (Fig. 3 A). Para frutos do controle observou-
272 se um decréscimo de H_2O_2 , aos seis dias de armazenamento. Frutos recobertos com bicamadas
273 apresentaram um leve acréscimo no conteúdo H_2O_2 aos oito dias de armazenamento, declinando
274 seguida para índices abaixo dos frutos controle. Este comportamento nos frutos recobertos, é
275 associado a presença de menor produção destes potencializadores de danos ao metabolismo
276 celular, através do estresse oxidativo. Mesmo armazenados em temperatura ambiente, as
277 bicamadas que promoveram menores valores destes, foram 0.43EO: 0.85C e a bicamada 0.50EO:
278 0.50C, com 14,57 e 16,18 H_2O_2 mol.g/amostra fresca, consequentemente.

279 Com fim de evitar o acúmulo de radicais livres, além de reparar os danos oxidativos, os
280 vegetais apresentam mecanismo de ação capaz de inibir os efeitos nocivos, causados por espécies
281 reativas de oxigênio (EROS). Nestes mecanismos envolvem as enzimas antioxidantes ascorbato
282 peroxidase - APX (Fig. 3 B), superóxido dismutase - SOD (Fig. 3. C) e a catalase - CAT (Fig.
283 3D), que atuam em sinergia com os compostos bioativos antioxidantes para inibir danos celulares.
284 O perfil de atividade destas enzimas, foi diretamente relacionada à composição da bicamada
285 aplicada nos frutos durante o armazenamento. Quando as atividades destas enzimas
286 aumentavam, os níveis de H_2O_2 decresciam constantemente. O aumento das atividades destas
287 enzimas foi mais evidentes entre os dias 02 e 08 em frutos sob recobrimentos em bicamadas. A
288 capacidade de remoção do H_2O_2 , tem efeito significativo, através da ação conjunta destas
289 enzimas, evitando assim, acúmulo de H_2O_2 nos tecidos vegetais e ao final do armazenamento a
290 atividade enzimática decai constantemente.

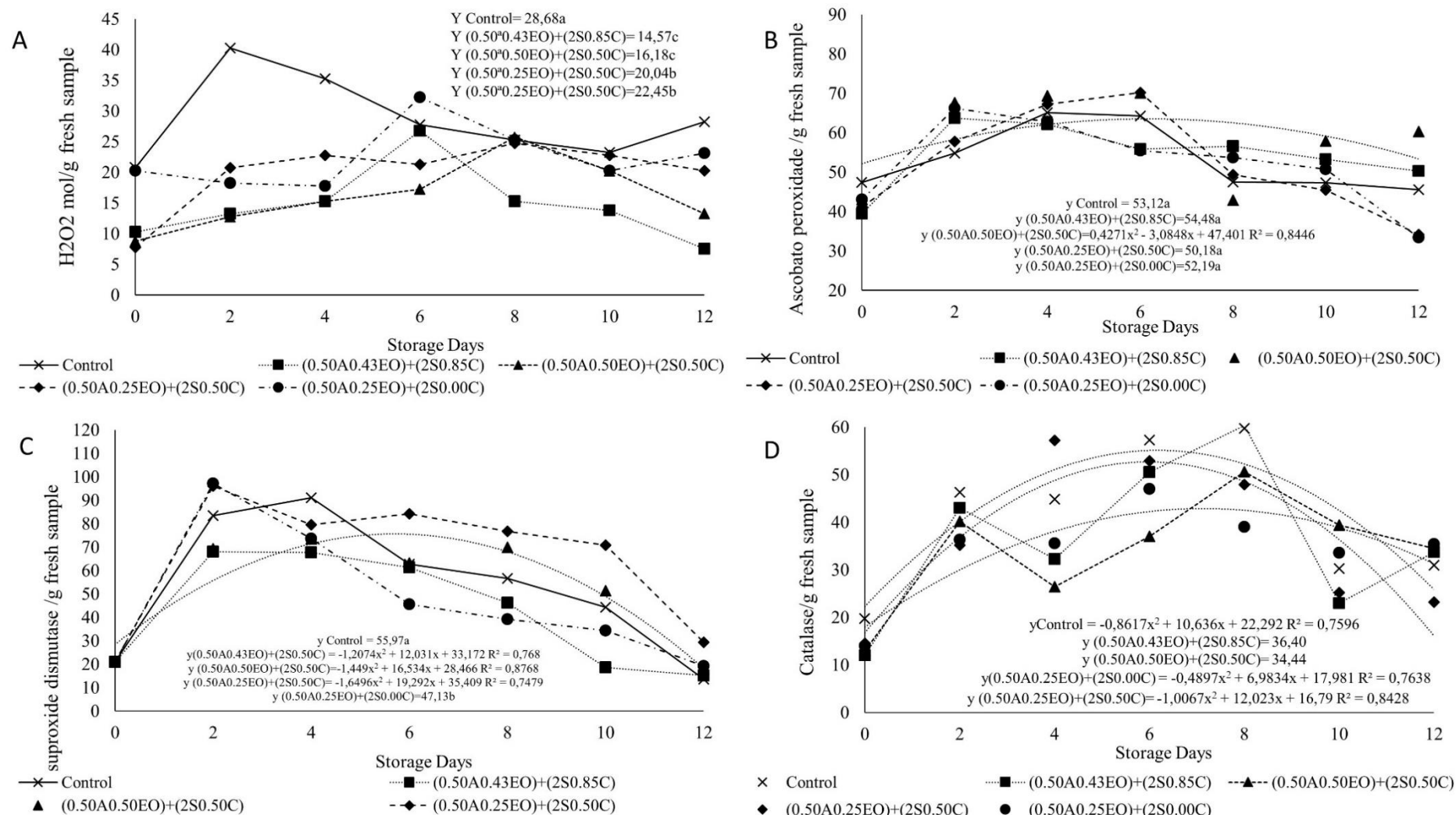


Figure 3. Levels of hydrogen peroxide (A), and activities of ascorbate peroxidase (B), superoxide dismutase (C), and Catalase (D) in Golden papaya coated with a bilayer composed of combinations of sodium alginate 0.5% (A) added of different levels of nanoemulsion of fennel essential oil (EO) in the first layer plus breadfruit starch 2% (S) added of different levels of quitosna (C) in the second layer, and the control (without coatings), during storage at room conditions (24 ±2.0 °C and 75 ± 3% RH) during 12 days.

3. 3. Severidade de desenvolvimento do *C. gleosporioides* nos frutos

A severidade causada em frutos de mamão Golden, recobertos com bicamadas, está evidenciado na Tabela 1. Nota-se, que houve diferença significativa ($p \leq 0,05\%$), no uso de diversas concentrações de antifúngicos, que surtiu efeito direto no desenvolvimento do fungo no fruto. O poder de ação da quitosana presente na primeira camada e dos nanoparticulados de óleo essencial de erva doce, presente na segunda camada, foram eficientes quando comparados do controle. Esta ação, foi capaz de inibir a o grau de severidade nos frutos, por esta disposta de forma independente, mais que, no entanto, agiram de forma sinérgica como antifúngicos. As formulações, que não mostraram diferenças significativas, e que apresentaram melhores resultados, quanto ao grau de severidade, com destaque, para as bicamadas que apresentaram, tamanhos abaixo de 1,5mm, apresentam concentrações de nanoparticulados, a partir de 0,25% de óleo essencial. Enquanto, que houve aumento e diferenças significativas, nas formulações que apresentaram menores ou nenhum percentual de nanoparticulados.

A ação sinérgica das bicamadas, que continham nanoparticulados e quitosana, contra o grau de severidade nos frutos inoculados com *C. gleosporioides*, quando comparado ao controle, foi evidente em formulações que apresentaram mínimos valores, do desenvolvimento do fungo *in vivo* (Tabela 1). As bicamadas que apresentam maiores diferenças significativas, apresentam maior grau de severidade, por ter em sua formulação quantidade insuficiente de antifúngicos, apresentando assim tamanhos de 8.90mm; 6.80mm; 5.3mm e 2.00mm, para a formulações: controle; 0.00: 0.50; 0.07: 0.15 e 0.07: 0.85 de nanoparticulados e quitosana, respectivamente. As bicamadas utilizadas na aplicação de frutos de mamão Golden e submetidos a avaliação durante 12 dias de armazenamento em temperatura ambiente, foram as que que apresentaram menor severidade em frutos. Dentre as formulações, incluindo o controle, 06 obtiveram melhores resultados. Destas, 04 foram escolhidas, por além de apresentarem menores valor de crescimento, serem formulações que apresentam concentrações intermediárias de antifúngicos com ação sinérgica, além de também demonstrar se está ação é eficiente, ou se o uso de apenas um antifúngico em formulação é suficiente para conservação dos frutos pós colheita. A aplicação das bicamadas com 043EO:085C; 0.50: 0.50EO; 0.25EO: 0.00C e 0.25EO: 0.50C de nanoparticulados e quitosana, foram aplicados e avaliados.

325 **Table 1.**Independent variables and degree of severity to *C. gleosporioides* (dependent) of golden papaya fruits coated with a bilayer composed of
326 combinations of sodium alginate added different levels of nanoemulsion of fennel essential oil in the first layer plus breadfruit starch 2% added of different
327 levels of quitosna in the second layer and control (without coatings).

Formulations	First Layer			Second Layer (Nanoemulsion)				Injury to fruits (mm)
	Starch (%)	Chitosan (%)	Glycerol (%)	OE* (%)	SA* (%)	Tween40® (%)	Glycerol (%)	
Control	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.90±2.81 ^a
(0.50A0.07EO) + (2S0.15C)	2.00	0.15	0.25	0.07	0.50	0.50	0.25	5.30±1.22 ^c
(0.50A0.43O) + (2S0.15C)	2.00	0.15	0.25	0.43	0.50	0.50	0.25	1.4±0.97 ^e
(0.50A0.07EO) + (2S0.85C)	2.00	0.85	0.25	0.07	0.50	0.50	0.25	2.00±2,30 ^d
(0.50A0.43EO) + (2S0.85C)	2.00	0.85	0.25	0.43	0.50	0.50	0.25	1,1± 1,32 ^e
(0.50A0.00EO) + (2S0.50C)	2.00	0.50	0.25	0.00	0.50	0.50	0.25	6,8±1,68 ^b
(0.50A0.50EO) + (2S0.50C)	2.00	0.50	0.25	0.50	0.50	0.50	0.25	1,3 ±1,67 ^e
(0.50A0.25EO) + (2S0.00C)	2.00	0.00	0.25	0.25	0.50	0.50	0.25	1,1±1,80 ^e
(0.50A0.25EO) + (2S1.00C)	2.00	1.00	0.25	0.25	0.50	0.50	0.25	1,0±2,2 ^e
(0.50A0.25EO) + (2S0.50C)	2.00	0.50	0.25	0.25	0.50	0.50	0.25	1,2±1,31 ^e
(0.50A0.25EO) + (2S0.50C)	2.00	0.50	0.25	0.25	0.50	0.50	0.25	1,3± 1,63 ^e
(0.50A0.25EO) + (2S0.50C)	2.00	0.50	0.25	0.25	0.50	0.50	0.25	1,1±1,75 ^e

328 .

329 *OE= Essential Oil Fennel; *AS= Sodium alginate. Means (± standard deviation) followed by the same letters in the column do not differ by the Tukey
330 test (p <0.05). n=3

5. Discussão

5.1 Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante

O ácido ascórbico é um dos principais antioxidantes hidrofílicos que captura os radicais livres que são prejudiciais ao corpo e outras espécies reativas de oxigênio (Naem et al, 2018). Além disso, sua ação tem efeito regenerador de outros antioxidantes importantes, por exemplo, tocoferol para o seu funcional estado (Denre et al, 2013). O conteúdo ascórbico mostrou uma tendência crescente em todas os frutos com bicamadas incluindo o controle durante o armazenamento (Fig. 1A), este fato pode estar relacionado a composição genética, fatores pré-colheita, maturidade e métodos preservativos utilizados na pós-colheita (Marín et al, 2004), como o uso de recobrimentos biodegradáveis na manutenção da qualidade dos frutos. Ao estudarem o uso de óleos essenciais de erva doce, folha de louro e de sementes de coentro, utilizados para recobrimentos em manga, Naem et al, (2018), encontraram teores de ácido ascórbico de 59.73%, 59.53% e 53.85%, respectivamente. Ainda de acordo com estes autores, o teor de ácido ascórbico como todos os outros constituintes bioquímicos na fruta aumenta com de acordo com avanço da maturidade, e a aplicação de filmes ao redor da fruta pode resultar na redução dessa taxa de aumento do ácido ascórbico, corroborando com os resultados obtidos neste estudo.

O conteúdo de flavonoides (Fig. 1B) em todas as formulações, apresentou valores crescentes, principalmente nos frutos controle. Fato que pode estar relacionado ao mecanismo de defesa dos frutos, devido ao estresse sofrido, através da temperatura de armazenamento, ou até mesmo a utilização de bicamadas como cobertura, modificando a atmosfera interna. Valores de flavonoides em um estudo de Silva et al. (2014) demonstrou elevado teor deste constituinte em polpa de mamão $97,39 \pm 0,96 \text{ mg.100 g}^{-1}$, há também elevados índices de flavonoides encontrados em laranjas não recobertas, quando comparadas a laranjas recobertas com cera de carnaúba, e mantidas em armazenamento a 24°C por 28 dias (Pereira, Machado e Costa, 2014).

A cor da polpa do mamão é determinada em grande parte pela presença de pigmentos denominados carotenoides, como representante destes estão o licopeno e o β -caroteno (Schweiggert et al., 2011). Estes podem aparecer em diversas concentrações, influenciadas pelo tipo de fruto, armazenamento e mecanismo de conservação dos frutos, como em melão recobertos com quitosana e *trans-cinamaldeído*, apresentou em 20 dias de armazenamento, teores de carotenoides 27% maiores do que o controle (Carvalho et al, 2016). Ainda de acordo com Almeida et al (2011), alimentos com presença de antioxidantes como ácido ascórbico e carotenoides desempenham papel fundamental na prevenção de doenças, através do consumo de frutas, além de serem de interesse. Os níveis de β -caroteno e licopeno nos frutos deste trabalho, foram crescentes no início do armazenamento e decrescentes a partir dos 08 dias, esta redução em mamão está relacionada a oxidação dos pigmentos

(Besinela Junior et al., 2010; Rivera-Lopez et al., 2005). Quando comparado com mamão recoberto com 1% de quitosana e 1% de solução de cloreto de cálcio, apresentaram aumento em seu conteúdo de licopeno (Ayon-Reyna et al. 2015).

Observa-se que para o teor de polifenóis (Fig. 1 A), os solventes extratores utilizados, metanol a 50% e acetona a 70% apresentaram comportamento diferentes para cada período de armazenamento dos frutos com ou sem bicamadas, houve crescente aumento no decorrer do avanço da maturidade dos frutos. O conteúdo de fenólicos também foi crescente durante período de armazenamento de 20 dias para mangas recobertas com goma agar e óleo essencial de erva doce e folha de louro (Naeem et al., 2018). As bicamadas 0.43EO: 0.85C; 0.25EO: 0.50C e 0.50EO: 0.50C, obtiveram os menores valores de polifenóis extraíveis, no entanto, obtiveram excelentes resultados contra o radical DPPH (Fig. 2). Um único ensaio não explica com precisão todos os grupos de compostos antioxidantes, particularmente em um sistema complexo, como matrizes de frutas. Portanto, diferentes ensaios antioxidantes precisam ser executados para garantir uma melhor comparação (Barros et al, 2017). Por isso, utilizamos atividades antioxidantes com radicais livres ABTS e DPPH, que utilizam reações de transferência de elétrons, havendo também a transferência de hidrogênio em menor intensidade.

Mesmo ao apresentar mecanismo similar de ação, estes dois radicais apresentam características estruturais diferentes, que implica numa escolha por afinidade dos compostos bioativos antioxidante a estes radicais. Fato constatado ao avaliar os mesmos extratos obtidos nestes estudo, para ambos os radicais, em que o comportamento das bicamadas com 0.25EO:0.00C, obteve melhores resultados, com o radical ABTS, enquanto que com o radical DPPH ele obteve resultados menos satisfatórios, em contra partida a bicamada 0.50EO:0.50C, que surtiu efeito no retardo da maturidade dos frutos, apresentou melhor resultado contra o radical DPPH e pior em relação ao ABTS, por apresentar os menores valores durante todo período de armazenamento. Ao comparar os resultados dos frutos bicamadas com de uvas recobertas com pectina e óleo essencial de canela, obtiveram elevados valores tanto para remoção do radical DPPH, quanto para o radical ABTS (Melgarejo-Flores et al., 2013). Já Milanez et al., (2018) ao estudarem atividade antioxidante e compostos fenólicos em frutos de buriti em diferentes estádios de maturação, obtiveram resultados elevados para ambas as determinações principalmente em frutos com maturação fisiológica completa.

5.4. Atividade Enzimática

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) presente neste estudo teve níveis elevados no começo do período de armazenamento, o mesmo de acordo com Barreiros e David (2006) exerce um papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares facilmente e gerar o radical hidroxila ($OH^\bullet$). Os níveis do H_2O_2 foram diretamente influenciados pelas bicamadas utilizadas, que reduziram a níveis mais baixos, fato justificado pelas mudanças em torno do tecido da fruta que retardou o processo celular respiratório com menor produção de EROs, do que o controle

que mostrou – se estatisticamente ($p < 0,05$) níveis mais elevados de H_2O_2 (Fig. 3 A). Estas mudanças podem estar associadas ao uso de quitosana na elaboração das bicamadas (Hong et al, 2012). Carvalho et al, 2016 ao utilizar quitosana na formulação de recobrimentos para melão, perceberam o efeito significativo ($p < 0,05$) na redução de H_2O_2 . Ao estudarem mamão os níveis Shadmani et al., (2015), indicaram este conteúdo de H_2O_2 aumentou durante estágio intermediário de maturação.

A utilização das bicamadas sobretudo as que continham 0.50% tanto de quitosana e naoparticulado de erva doce, apresentaram menores atividades em todas as enzimas, mais os frutos que apresentaram maiores atividades, tinham grau de maturidade avançado. A atividade da enzima APX (Fig 3 B) apresenta tendência decrescente no decorrer do período, mais com maiores níveis desta aos 06 dias de armazenamento. Esse comportamento também foi semelhante em melão (Carvalho et al., 2016), maçãs (Imahori et al., 2008) armazenadas a 6°C e mamão mantidos a temperaturas de 6°C e 12°C (Shadmani et al, 2015). Em todos estes estudos, o aumento da temperatura resultou no aumento da atividade enzimática da APX e este aumento pode resultar na síntese desta enzima (Ghasemnezhad et al., 2008). A forma como está enzima age é através da utilização do ascorbato como doador específico de elétrons para reduzir o H_2O_2 à água, o que gera monodehidroascorbato que, por sua vez, é regenerado novamente a ascorbato para que o sistema antioxidante se mantenha ativo (Shadmani et al, 2015).

O constante aumento e diminuição da atividade da CAT (Fig 8 D), durante período de armazenamento dos frutos de mamão com as bicamadas, está associado a tendência flutuante desta enzima, pelo aumento do conteúdo de H_2O_2 (Huang et al., 2008), principalmente nos frutos controle, onde, obtiveram maiores valores desta enzima, e que estão mais expostos a fatores de estresse extrínsecos. Ao comparar com outros frutos em que foram aplicados diferentes tratamentos pós colheita, houve uma menor expressão de CAT foi encontrada em bananas tratadas com água quente do que no controle de frutos durante o armazenamento refrigerado (Wang et al., 2012). Já Shadmani et al., (2015) ao estudar atividade enzimática da CAT em mamão, encontraram aumento da atividade frutos armazenados a 12°C, este aumento, está associado a decomposição do peróxido de hidrogênio, que causaria a formação de radicais hidroxila e o alívio da lesão por descolamento induzida pelo resfriamento. A diminuição da atividade da enzima CAT, visualizada neste estudo no início e no fim do período de 12 dias, pode levar ao acúmulo de H_2O_2 . O acúmulo desse metabólito, decorrente da redução das atividades de CAT, por sua vez, poderia resultar no estímulo na atividade da APX (Shadmani et al., 2015). A APX é considerada de maior eficiência para a decomposição do H_2O_2 o aumento constatado em sua atividade pode ter sido decorrente da necessidade de se decompor o H_2O_2 formado, ainda que em menores proporções, nos ciclos finais de seleção.

Atividade da SOD (Fig. 3 C), foi elevada nos seis primeiros dias de armazenamento, após houve decréscimo em todos os frutos bicamadas. Até os 04 dias a atividade da SOD aumentou e

diminuiu acentuadamente, kondo et al., (2005), sugerem que ao aumentar a temperatura de armazenamento dos frutos, a atividade da SOD consequentemente aumenta, acarretando uma ligação entre esta enzima e a atividade de eliminação ($O_2^{\cdot -}$). Com isso, a atividade da SOD pode inibir o acúmulo de radicais superóxido durante armazenamento e consequentemente reduzem os danos nos tecidos, por melhorar a habilidade da fruta em dismutar os radicais superóxido (VICENTE et al., 2006). Ao relacionar os resultados com os encontrados por Shadmani et al., (2015), percebe-se que os níveis de atividade enzimática para mamão armazenado a 12°C foi similar ao encontrado neste estudo com armazenamento de mamão a 20°C.

5.5 Severidade em Frutos

Ao avaliar o grau de severidade ocasionada nos frutos de mamão, percebe-se que houve diferenças significativas, em relação aos percentuais utilizados dos antifúngicos quitosana e nanoparticulados de óleo essencial de erva doce, bem como, a ação conjunta de ambos. A utilização de óleos essenciais, pode fornecer uma ampla variedade de compostos biodegradáveis, como alternativas aos fungicidas sintéticos, seu potencial para controle de doenças pós colheita, reside precisamente em sua atividade antimicrobiana (Burg, 2004). Estudos mostram que a utilização destes antifúngicos, contra o grau de severidade provocada em frutos por *C. gleosporioides*, não é necessário o uso de elevados percentuais.

Ao estudarem efeito do óleo essencial Bosquez-Molina et al., (2010), de tomilho sobre o *C. gleosporioides*, indicaram que teor de 0.1% deste óleo já era suficiente para combater em 50% a incidência deste fitopatógeno em frutos de mamão, além de não produzir modificações sensoriais indesejáveis aos frutos. Ainda de acordo com Bautista Banos et al., 2013, os óleos essenciais são líquidos concentrados de característica hidrofóbica, contendo mistura de compostos aromáticos voláteis, resultante do metabolismo secundário das plantas, com ação direta no controle sobre fitopatógenos. E por isso, recomendasse que sua utilização seja em pequenos percentuais, como em óleo essencial de canela (0.1%) em combinação com própolis verde (5%), provocou 100% de inibição de *C. capsici* no controle da antracnose em pimentas. Por apresentar elevado poder antifúngico, o uso de óleo essencial na condição nanoparticulado e disposto em camada de contato indireto no fruto, faz com que não ocorra injúrias provocadas pela ação componente antifúngicos, que agem não só contra inúmeros microrganismos, mais também podem provocar imperfeições nas cascas dos frutos.

O efeito antifúngico da quitosana em recobrimentos biodegradáveis vem sendo relatado constantemente por pesquisadores, em 1.50% deste, sua ação contra antracnose em pimentão verde, causada também por *C. capsici*, diminuiu em cerca de 76% a severidade causada nestes vegetais, durante período de armazenamento de 28 dias (Edirisinghe et al. 2012). Além disso, a utilização desse antifúngico na elaboração de filmes, tem ação como barreira, limitando assim a penetração do fungo, estimulando reações estruturais de defesa ao longo da parede celular, além de ativação das enzimas

relacionadas a defesa (Bautista-Baños et al., 2006). Não se sabe que tipo de mecanismo a quitosana utilizada neste estudo, utilizou para inibir o grau de severidade em frutos de mamão (Table 1), mais existem alguns mecanismos que podem ter ocorrido neste estudo, como a interação entre moléculas de quitosana carregadas positivamente devido a grupos de amônio e resíduos carregados negativamente na superfície da parede celular do fungo devido a grupos de cabeça fosfolipídios, que levar a aumentar a permeabilidade da membrana plasmática (Leuba e Stossel, 1986), além da interação com o DNA da célula, alterando a sua conformação, bem como, a síntese de RNA e proteínas (Hadwiger e Loschke, 1981). Ao estudarem o efeito da quitosana, pectina e cloreto de cálcio na elaboração de recobrimentos multicamadas aplicadas em mamão Brasil et al, (2012) evidenciou que a utilização destes compostos foi suficiente para reduzir em de 8 log/UFC g para 2 log/ UFC g de leveduras e fungos.

6. Conclusões

O retardo do amadurecimento foi claramente observado em frutos das formulações que continha na primeira camada 2% de amido de fruta pão e 0.5 de quitosana e na segunda camada 0.50% de alginato de sódio e 0.50% da nanoemulsão de óleo essencial de erva doce, que manteve os teores de ácido ascórbico, flavonoides amarelos, polifenóis extraíveis totais e atividade antioxidante elevada, principalmente contra o sequestro do radical DPPH, além de reduzir os níveis de H₂O₂ e a atividade de enzimas do metabolismo antioxidante, indicando menores níveis de estresses aos frutos. Os recobrimentos empregados em mamão da variedade Golden, na forma de bicamadas foram efetivos contra o desenvolvimento do fungo *C. gleosporioides*, nas formulações (0.50A0.25EO) + (2S0.50C) e (0.50A0.50EO) + (2S0.50C) e com percentuais de óleo essencial de erva doce (0.25 e 0.5%) e quitosana (0.5%).

7. Referências

- Acosta, S., Chiralt, A., Santamarina, P., Rosello, J., Gonzalez-Martínez, Z., Chafer, M., 2016. Antifungal films based on starch-gelatin blend, containing essential oils. **Food Hydrocoloyde**, 61,233–240.
- Almeida, M. M. B., Sousa, P. H. M., Arriaga, A. M. C., Prado, G. M., Magalhaes, C. E. C.,Maia, G. A., 2011. Bioactives compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, 44, 2155–2159.
- Antunes, M. D., Gago, C. M., Cavaco, A. M., Miguel, M. G., 2012. Edible coatings enriched with essential oils and their compounds for fresh and fresh-cut fruit. Recent Pat. **Food Nutrition Agriculturae**, 4, 114–122.

502 Ayón-Reyna, L. E., González-Robles, A., Rendón-Maldonado, J. G., Báez-Flores, M.
503 E., López-López, M. E., Vega-García, M. O., 2017. Application of a hydrothermal-calcium
504 chloride treatment to inhibit postharvest anthracnose development in papaya. **Postharvest**
505 **Biology Technology**, 124, 85–90.

506 Bautista-Baños, S., Hernandez-Lauzardo, A.N., Velazquez-del Valle, M.G., Hernandez-
507 L_opez, M., Barka, A.E., Bosquez-Molina, E., Wilson, C.L., 2006. **Review:** chitosan as a
508 potential natural compound to control pre and post-harvest diseases of horticultural
509 commodities. **Crop Protection** 25, 108-118.

510 Bautista-Baños, S., Sivakumar, D., Bello-Pérez, A., Villanueva-Arce, R., Hernández-López,
511 M., 2013. A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit
512 during the postharvest supply chain. **Crop Protection**, 49, 8–20.

513 Besinela Junior, E., Monarim, M. M. S., Camargo, M., MahL, C. R. A., Simões, M. R.; Silva,
514 C. F., 2010 Efeito de diferentes biopolímeros no revestimento de mamão (*Carica papaya* L.)
515 minimamente processado. **Revista Varia Scientia Agrárias**, 01, 131 – 142.

516 Blume, D.E., McClure, J., 1980. Developmental effects of Sandz oil of enzymes of phenolic
517 and general metabolism in barely shoots grown in the dark or under low of high intensity light.
518 **Plant Physiology**, 65, 234–238.

519 Brand-williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C., 1995. Use of free radical method to evaluate
520 antioxidant activity. **Food Science Technologie**, 28, 25-30.

521 Bosquez-Molina, E., Ronquillo-de Jesúsa, E., Bautista-Banos, S., Verde-Calvo, J. R., Morales-
522 López, J., 2010. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides*
523 and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings.
524 **Postharvest Biology and Technology**, 57, 132–137.

525 Bonilla, J., Fournari, E., Atarés, L., Chiralt, A., Kenny, J. M., 2014. Physical, structural na
526 dantimicrobial properties of polyvinyl alcohol-chitosan biodegradable films. **Food**
527 **Hydrocolloids**, 35, 463–470.

528 Burg, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in
529 foods—a review. **International Journal Food Microbiology**, 94, 223–253.

530

531 Chen, H. Hu, X., Chen, E., Wu, S., McClements, D. J., Liu, S., Li, B., Li, Y., 2016.
 532 Preparation, characterization, and properties of chitosan films with cinnamaldehyde
 533 nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, 61, 662-671.

534 Choudhary, B., Nagpure, A., Gupta, R.K., 2015. Biological control of toxigenic citrus
 535 and papaya-rotting fungi by *Streptomyces violascens* MT7 and its extracellular metabolites.
 536 **Journal Basic Microbiol.** 55, 1343–1356.

537 Dantas, R. L., Silva, S. M., Brito Primo, D. M., Sousa, A. S. B., Brito, E. S., Macedo, E. M. S.,
 538 2015. Changes during maturation in the bioactive compounds and antioxidant activity of
 539 *Opuntia stricta* (haw.) Fruits. **Acta Horticulturae**, 1067, 159 – 165.

540 Denre, M., Chakravarty, A., Pal, S., Bhattachary, A., 2013. Changes in some biochemical
 541 characteristics in response to foliar applications of chelator and micronutrients in green
 542 pungent pepper, Int. **Journal Plant Physiol. Biochem**, 5, 25–35.

543 Dhall, R. K., 2013. Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: A review.
 544 Critical Reviews in **Food Science and Nutrition**, 53, 435–450.

545 Edirisinghe, M., Ali, A., Maqbool, M., Alderson, P 2012. Chitosan controls postharvest
 546 anthracnose in bell pepper by activating defense-related enzymes. **Journal Food Science**
 547 **Technology**, 51, 4078-4083.

548 Francis, F. J., 1982. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.), Anthocyanins as
 549 food colors. New York: **Academic Press**, 181 – 207.

550 Gardesh, A. S. K., Badii, F., Hashemi, M., Ardakani, A. Y., Maftoonazad, N., Gorji, A. M.,
 551 2016. Effect of nanochitosan based coating on climacteric behavior and postharvest shelf-life
 552 extension of apple cv. Golab Kohanz. **Food Science and Technology**, 70, 33-40.

553 Ghasemnezhad, M., Marsh, Shilton, R., Woolf, A., 2008. Effect of hot water treatments on
 554 chilling injury and heat damage in ‘satsuma’ mandarins: Antioxidant enzymes and vacuolar
 555 ATPase, and pyrophosphatase. **Postharvest Biology and Technology**, 48, 364-371.

556 Giada, M. L. R., 2014. Uma abordagem sobre a capacidade antioxidante in vitro de alimentos
 557 vegetais e bebidas. **Demetra: alimentação, nutrição e saúde**, 9, 137-146.

558 Hadwiger, L.A., Loschke, D.C., 1981. Molecular communication in host-parasite interactions:
 559 hexosamine polymers (chitosan) as regulator compounds with in race-specific and other
 560 interactions. **Phytopathology**, 71, 756-762.

- Hong, K., Xie, J., Lubin Zhang, Dequan Sun, Deqiang Gong, 2012. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) fruit during cold storage. **Scientia Horticulturae**, 144, 172–178.
- Huang, R. H., Liu, J. H., Lu, Y. M., Xia, R. X., 2008. Effect of salicylic acid on the antioxidante system in the pulp of ‘Cara cara’ navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) at different storage temperatures. **Postharvest Biol. Technology**, 47, 168–175.
- Jimenez, A., Fabra, M. J., Talens, P., Chiralt, A., 2012. Edible and biodegradable starch films: a review. **Food Bioprocess Technology**, 5, 2058 – 2076.
- Kanatt, S. R., Rao, M. S., Chawla, S. P., Sharma, A., 2012. Active chitosan–polyvinylalcohol films with natural extracts. **Food Hydrocolloids**, 29, 290–297.
- Kondo, S., Kittikorn, M., Kanlayanarat, S., 2005. Preharvest antioxidant activities of tropical fruit and the effect of low temperature storage on antioxidants and jasmonates. **Postharvest Biology and Technology**, 36, 309-318.
- Leuba, J.L., Stossel, P., 1986. Chitosan and other polyamines: antifungal activity and interaction with biological membranes **Chitin in Nature and Technology**, 215-222. Springer US.
- Li, X.; Zhu, X.; Mao, J.; Zou, Y.; Fu, D.; Chen, W.; Lu, W., 2013. Isolation and characterization of ethylene response factor family genes during development, ethylene regulation and stress treatments in papaya fruit. **Plant Physiology and Biochemistry**, 70, 81-92.
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Xie, Z., Liu, Y., You, Y., Zhang, X., Sun, Z., Li, W., Li, Y., Wang, Q., 2017. The impact of the postharvest environment on the viability and virulence of decay fungi. **Crit. Rev. Food Science**, 58, 1681-1687.
- Mahajan, P. V.; Goswani, T. K., 2001. Enzyme kinetics based modeling of respiration rate of apple. **Journal Agricultural Engineeering Research**, Amsterdam, 79, 399-406.
- Milanez, J. T., Neves, L. C., Colombo, R. C., Shahab, M., Roberto, S. R., 2018. Bioactive compounds and antioxidant activity of buriti fruits, during the postharvest, harvested at different ripening stages. **Scientia Horticulturae**, 227, 10–21.

590 Kadir, J., Awang, Y., Tayebimeigooni, A., Shojaei, T.R., 2014. Effect of pre-harvest calcium
 591 chloride applications on fruit calcium level and post-harvest anthracnose disease of papaya.
 592 **Crop Protection**, 55, 55–60.

593 Madani, B., Mohamed, M. T. M., Biggs, A. R., Kadir, J., Awang, Y., Tayebimeigooni, A.,
 594 Shojaei, T. R., 2014. Effect of pre-harvest calcium chloride applications on fruit calcium level
 595 and post-harvest anthracnose disease of papaya. **Crop Protection**, 55, 55–60.

596 Marín, A., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I., 2004. Characterization and
 597 quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.), *J. Agric.*
 598 **Food Chemistry**, 52, 3861–3869.

599 McAtee, P., Karim, S., Schaffer, R. J., 2013. A dynamic interplay between phytohormones is
 600 required for fruit development, maturation, and ripening. **Frontiers in Plant Science**, 4, 79.

601 Melgarejo-Flores, B. G., Ortega-Ramirez, L. A., Silva-Espinoza, B. A., González-Aguilar,
 602 Miranda, M. R. A., Ayala-Zavala, J. F., 2013. Antifungal protection and antioxidant
 603 enhancement of table grapes treated with emulsions, vapors, and coatings of cinnamon leaf oil.
 604 **Postharvest Biology and Technology**, 86, 321-328.

605 Mohapatra, D.; Mishra, S.; Singh, C. B.; Jayas, D. S., 2010. Post-harvest processing of
 606 banana: opportunities and challenges. **Food Bioprocess Technology**, 4, 327-339.

607 Naeem, A., Abbas, T., Ali, T., Hasnain, A., 2018. Effect of guar gum coatings containing
 608 essential oils on shelf life and nutritional quality of green-unripe mangoes during low
 609 temperature storage. **International Journal of Biological Macromolecules**, 113, 403–410.

610 Nagata, M.; Yamashita, I., 1992. Simple method for simultaneous determination of
 611 chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. **Journal of Japanese Society of Food Science**
 612 **and Technology**, 39, 925 – 928.

613 Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific
 614 peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol**, 22, 867-880.

615 Nukuntornprakit, O., Chanjirakul, K., Doorn, W. G. D., Siriphanicha, j., 2015. Chilling injury
 616 in pineapple fruit: Fatty acid composition and antioxidant metabolism. **Postharvest Biology**
 617 **and Technology**, 99, 20–26.

618 Nwokocha, L. M.; Williams, P. A., 2011. Comparative study of physicochemical properties
 619 of breadfruit (*Artocarpus altilis*) and white yam starches. **Carbohydrate Polymers**, 85, 294–
 620 302.

621 Perdonés, A., Vargas, M., Atarés, L., Chiratl, A., 2014. Physical, antioxidant and antimicrobial
622 properties of chitosan-cinnamon leaf oil films as affected by oleic acid. **Food Hydrocolloids**,
623 36, 256-264.

624 Pereira, G. S., Machado, F. L. C., Costa, J. M. C., 2014. Aplicação de recobrimento prolonga a
625 qualidade pós-colheita de laranja ‘Valência Delta’ durante armazenamento ambiente. **Revista**
626 **Ciência Agronômica**, 45, 520-527.

627 Poverenov, E., Danino, S., Horey, B., Granit, R., Vinokur, Y., Rodov., 2014. Layerby-layer
628 electrostatic deposition of edible coating on fresh cut melon model: anticipated and
629 unexpected effects of alginate-chitosan combination. **Food and Bioprocess Technology**, 7,
630 1424–1432.

631 Romanazzi, G., Feliziani, E., Baños, S.B., Sivakumar, D., 2017. Shelf life extension of
632 freshfruit and vegetables by chitosan treatment. Crit. Ver. **Food Sci. Nutr.** 57, 579–601.

633 Ruggiero, C., Marin, S. L. D., Durigan, J. F., 2011. Mamão, uma história de sucesso. **Revista**
634 **Brasileira de Fruticultura**, Volume Especial, 076-082.

635 Salvia-Trujillo, L., Rojas-Grau, A. R., Soliva – Fourtuny, R., Martin – Belloso, O., 2013.
636 Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized
637 lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, 30, 401-407

638 Severino, R., Ferrari, G., Vu, K. D., Donsì, F., Salmieri, S., Lacroix, M., 2015. Antimicrobial
639 effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified
640 atmosphere packaging and gamma irradiation against Escherichia coli O157:H7 and
641 Salmonella Typhimurium on green beans. **Food Control**, 50, 215-222.

642 Shadmania, N., Ahmad, S. H., Saari, N., Ding, P., Tajidin, N. E., Donsi, D. K., Salmiere, F.,
643 Lacroix, S. M., 2015. Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing
644 nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against
645 Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium on green beans. **Food Control**, 50,
646 215-222.

647 Schweiggert, R. M. Schweiggert, C. B., Steingass, A., Heller, P., Esquivel, R., 2011.
648 Characterization of chromoplasts and carotenoids of red- and yellow-fleshed papaya (*Carica*
649 *papaya* L.). **Planta**, 234, 1031-1044.

650 Silva, L. M. R., Figueiredo, E. A. T., Ricardo, N. M. P. S., Vieira, I. G. P., Figueiredo, R. W.,
651 Brasil, I. M. 2014. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical
652 641 fruits from Brazil. **Food Chemistry**, 143, 398–404

- Siurana, M. P. S., Rosello, J., Santamarina, S. M. G., Sanz-Berzosa, I., 2015. Antifungal activity and potential use of essential oils against *Fusarium culmorum* and *Fusarium verticillioides*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, 18, 359-367.
- Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mohammadi, U., Ghasemlou, H., Ojagh, S. M., Hosseini, S. M., Khaksar, R., 2013. Characterization of antioxidant-antimicrobial κ -carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, 52, 116-24.
- Soliva-Fortuny, R. Polysaccharide coatings extend fresh-cut fruit shelf life., 2010. **Emerging Food Research and Development Report**, 21, 1-2.
- Strohecker, R., Henning, H. M., 1967. Análises de vitaminas: métodos comprovados, **Madrid: Paz Montolvo**, 428 p.
- Tan, Y. M., Lim, S. H., Tay, B. Y., Lee, M. W., Thian, E. S., 2015. Functional chitosan- based grape fruits seed extract composite films for applications in food packaging. **Technology Materials Research Bulletin**, 69, 142–146.
- Valencia-Chamorro, S. A., Palou, L., Del Rio, M. A., Perez-Gago, M. B., 2013. Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and Vegetables: a review. **Crit. Rev Food Science**, 51, 872–900.
- Valenzuela, N.L., Angel, D.N., Ortiz, D.T., Rosas, R.A., García, C.F.O., Santos, M.O., 2015. Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit. **Biology Control**, 91, 88–93.
- Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, 151, 59–66.
- Vicente, A. R., Martinez, G. A., Chaves, A. L., Civello, P. M., 2006. Effect of heat treatment on strawberry fruit damage and oxidative metabolism during storage. **Postharvest Biol. Technology**, 40, 116–122, 2006.
- Wang, H., Zhang, Z., Xu, L., Huang, X., Pang, X., 2012. The effect of delay between heat treatment and cold storage on alleviation of chilling injury in banana fruit. **J. Sci. Food Agric.** 92, 2624–2629.

684

685

686

687

688

689

690

691

6. Considerações Finais

Filmes bicamadas foram elaborados através do uso de amido de fruta pão, alginato de sódio, quitosana e óleo essencial de erva doce. Os mesmos apresentaram boas propriedades físicas (permeabilidade, solubilidade, espessura e opacidade) e microbiológicas sobre o *C. gleosporioides*.

A utilização do amido de fruta pão como matéria prima para elaboração da primeira camada foi possível, pelo mesmo apresentar elevados teores de amilose e amilopctina. Sua junção com a quitosana proporcionou uma primeira camda com propriedades cristalinas. A elaboração da nanoemulsão estável foi possível pela união do alginato de sódio e óleo essencial de erva doce.

C. gleosporioides não foi resistentes a concentrações de 0.50% e 1% de quitosana, bem como, a concentrações de 0.25%, 0.43% e 0,50% de nanoemulsão.

Os frutos de mamão apresentaram baixa atividade respiratória, prolongamento da vida útil, manutenção das características físico químicas (sólidos solúveis, ratio SS/AT, cor da casca) e funcionais (ácido ascórbico, flavonoides amarelos e polifenóis) durante todo período de armazenamento, além de apresentarem elevada atividade antioxidante com os radicais DPPH e ABTS. Sobretudo os frutos que receberam o filme bicamada com 0.50% (para cada antifúngico) de quitosana e óleo essencial de erva doce. Consequentemente obtiveram também baixa atividade enzimática e redução dos níveis de peróxido de hidrogenio.

Sensorialmente os frutos foram bem aceitos, com notas elevadas para o atributo sabor doce e odor característico. Além disso, danos ocorridos nos frutos com filmes bicamadas, foram mínimos quando comparados ao controle e apresentaram elevada aceitação dos julgadores.

O processo de elaboração dos filmes multiicamadas foi depositado como patente, bem como, seu produto (filmes), a fim de serem utilizados para manutenção da qualidade pós colheita de frutas.