

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
NUTRIÇÃO

LARISSA LIMA DE SOUSA

APLICAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Rosmarinus officinalis*
L. E *Origanum vulgare* L. NO CONTROLE DE FUNGOS
PATÓGENOS PÓS-COLHEITA EM *Vitis labrusca* L. (UVA
ISABEL)

JOÃO PESSOA - PB

2013

LARISSA LIMA DE SOUSA

APLICAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Rosmarinus officinalis*
L. E *Origanum vulgare* L. NO CONTROLE DE FUNGOS
PATÓGENOS PÓS-COLHEITA EM *Vitis labrusca* L. (UVA
ISABEL)

JOÃO PESSOA - PB

2013

LARISSA LIMA DE SOUSA

APLICAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Rosmarinus officinalis*
L. E *Origanum vulgare* L. NO CONTROLE DE FUNGOS
PATÓGENOS PÓS-COLHEITA EM *Vitis labrusca* L. (UVA
ISABEL)

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências da
Nutrição do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal da
Paraíba, em cumprimento aos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Nutrição.
Área de concentração: Alimentos e
Nutrição.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

JOÃO PESSOA - PB

2013

S725a Sousa, Larissa Lima de.

Aplicação dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. e *Origanum vulgare* L. no controle de fungos patógenos pós-colheita em *Vitis labrusca* L. (Uva Isabel) / Larissa Lima de Sousa.- João Pessoa, 2013.

74f.

Orientador: Evandro Leite de Souza

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS

1. Nutrição. 2. Orégano. 3. Alecrim. 4. Óleos essenciais.
5. Sinergismo. 6. Uvas - alteração pós-colheita.

UFPB/BC

CDU: 612.39(043)

LARISSA LIMA DE SOUSA

APLICAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Rosmarinus officinalis* L. E *Origanum vulgare* L. NO CONTROLE DE FUNGOS PATÓGENOS PÓS-COLHEITA EM *Vitis labrusca* L. (UVA ISABEL)

Dissertação _____ em 22/03/2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Evandro Leite de Souza
DN/CCS/UFPB
Orientador

Prof. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
DCF/CCS/UFPB
Membro externo

Profa. Dra. Marta Suely Madruga
DEA/CT/UFPB
Membro interno

Profa. Dra. Marciane Magnani
Membro Interno Suplente
DEA/CT/UFPB

Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio
DCOS/CCS/UFPB
Membro Externo Suplente

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, minha Nossa Senhora e meus anjos, por guiarem meu caminho, por se fazerem tão presente em minha vida, me consolar durante minhas angústias e aflições, me erguer, me capacitar e me fazer merecedora de tantas maravilhas.

Aos meus pais Ana e Nô, pelos ensinamentos, fortalecimento, amizade, exemplos de amor ao próximo e honestidade, pelos investimentos em minha educação, por me fazerem enxergar que a vida não é um mar de rosas, mas que estão sempre junto de mim para me encorajar a seguir adiante, e principalmente, pelo amor incondicional.

Às minhas tias Nilma, Nilda, Lourdinha, Corrinho, Penha, e especialmente tia Nilza, pelas orações, carinho, conselhos, força e pela ajuda financeira no difícil início dessa jornada.

Aos meus irmãos Nielson e Nívison, à minha vovó Zefinha, tios, primos (em especial Edwiges), amigos (em especial Suellen e Isabella França) e familiares que, perto, longe, ou no coração, sempre me apoiaram e me deram auxílio, com orações, sentimentos, gestos, palavras e pensamentos positivos.

Ao meu vovô Nicanor (*in memorian*), que tanto valorizava os estudos de sua prole e lá no plano em que está, tenho certeza que está super orgulhoso de sua neta Larita.

Ao Professor Dr. Evandro Leite de Souza, exemplo de pesquisador, pela valiosa oportunidade e honra em tê-lo como orientador. Agradeço pelo acolhimento, atenção, dedicação e, principalmente, pela paciência e compreensão que pude contar quando precisei me dividir entre os estudos e o trabalho.

Ao meu amigo-irmão doutorando Eduardo que em um certo período de minha vida, diferente de muitas pessoas que me rodeavam, enxergou minha alma arrasada, ofereceu seus ouvidos, seu tempo, e se esforçou para me ver bem, sorrindo. Incentivou-me em minha “vida científica”, sempre disposto a me ajudar em todo o percurso, acreditou mais em mim do que eu mesma, e foi quem me disse: tenta a seleção do mestrado que você consegue, e consegui...

À minha amiga graduanda Sonálle que de um auxílio na execução do trabalho virou uma bela amizade, pelos ótimos momentos que passamos juntas fazendo as análises, e principalmente, por não me abandonar e ter a coragem e maturidade de assumir os experimentos finais quando não pude mais estar tão presente.

À Professora Maria Lúcia da Conceição, que acreditou em mim ao me acolher no laboratório e aceitar me orientar no PIVIC quando eu me dividia entre faculdade e trabalho. Grande mulher, exemplo de profissional, de sabedoria, de dedicação e de carinho demonstrado a todos os alunos.

Ao povo do meu agrado, os labinhos Nereide, Camila, Neusa, Ana Júlia, Helena, Rayanne, Nelson, Jossana, Elieidy, Ingrid, Dona Salete, Priscila, Isabelle e Vanessa pela amizade, ajuda, e pelos bons momentos que passamos juntos no laboratório.

Aos meus colegas da turma do mestrado, em especial minha grande amiga Carol, com quem passei alguns momentos de sufoco e muitos momentos agradáveis e alegres.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Nutrição pela presteza e simpatia com que sempre atendia.

Aos Professores Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, Profa. Dra. Marta Suely Madruga, Profa. Dra. Marciane Magnani e Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio, que participaram da banca de avaliação e contribuíram para aperfeiçoamento desse trabalho.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

E àqueles que não foram citados, mas estiveram presentes nas horas em que mais precisei, para brindar, orar, rir, abraçar, ou apenas compartilhar um silêncio. MUITO OBRIGADA!

“Lembre da minha ordem: seja firme e corajoso! Esforça-te, e tem bom ânimo; não temas, nem te espantes; porque eu, o Senhor, teu Deus, estarei contigo em qualquer lugar onde fores!” [Josué 1:9]

RESUMO

A uva Isabel (*Vitis labrusca* L.), é um fruto não climatérico, com baixa atividade fisiológica, muito sensível à desidratação e infecção fúngica durante o manuseio no processamento pós-colheita. A dificuldade no tratamento e controle de infecções fúngicas e o crescente reconhecimento de seu impacto na produção de frutos tem estimulado a pesquisa de métodos alternativos capazes de controlar o desenvolvimento de fitopatógenos e, conseqüentemente, a redução das perdas pós-colheita. A utilização de óleos essenciais para aplicação em alimentos tem se mostrado uma forma promissora como método de conservação devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes. O presente estudo avaliou a eficácia da aplicação dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. (OEOV) e *Rosmarinus officinalis* L. (OERO) isoladamente e em combinação como inibidores de crescimento dos fungos patógenos pós-colheita *Rizhopus stolonifer* URM 3728, *Aspergillus flavus* URM 4540 e *Aspergillus niger* URM 5842 em meio laboratorial e em uvas Isabel (*Vitis labrusca* L.) e sua influência sobre a microbiota autóctone, características físicas, físico-químicas e sensoriais dos frutos durante o armazenamento em temperatura ambiente (25 °C por 12 dias) e refrigerada (12 °C por 24 dias). O OEOV e o OERO revelaram valores de CIM de 0,25 e 1 µL/mL, respectivamente, frente a todos os fungos testados. A aplicação dos óleos essenciais em diferentes concentrações (CIM OERO 1 µL/mL; CIM OEOV 0,25 µL/mL; $\frac{1}{2}$ CIM OEOV 0,125 µL/mL + $\frac{1}{2}$ CIM OERO 0,5 µL/mL; $\frac{1}{4}$ CIM OEOV 0,06 µL/mL + $\frac{1}{4}$ CIM OERO 0,25 µL/mL) inibiu o crescimento micelial (95,18 – 99,46%) e germinação de esporos (> 75%) dos fungos utilizados nos testes, além de inibir o crescimento de estirpes dos fungos testados em uvas artificialmente infectadas, bem como a micoflora autóctone de uvas armazenadas em temperatura ambiente e a baixa temperatura. Em geral, a aplicação do revestimento composto por OEOV e OERO em concentrações sub-letais preservou a qualidade das uvas, considerando seus atributos físicos (cor, firmeza, perda de massa), físico-químicos (acidez titulável, sólidos solúveis e relação acidez tituláveis/sólidos solúveis) e sensoriais ao longo dos tempos de armazenamento avaliados. Os resultados obtidos no estudo demonstraram o potencial de OEOV e OERO para o controle de fungos patogênicos pós-colheita de frutos, em particular, de *R. stolonifer*, *A. flavus* e *A. niger* em uvas de mesa.

Palavras-chave: orégano, alecrim, óleos essenciais, sinergismo, uvas, alterações pós-colheita.

ABSTRACT

The Isabella grape (*Vitis labrusca* L.), whose clusters have berries ripening fast and very crowded, it is a non-climacteric fruit with low physiological activity, very sensitive to dehydration and fungal infection during handling in post-harvest processing. The difficulty in the treatment and control of fungal infections and increasing recognition of their impact on fruit production has encouraged the search for alternative methods capable of controlling the growth of pathogens and thereby reducing post-harvest losses. The use of essential oils for use in foods has been shown as a promising method of preservation due to its antimicrobial properties and antioxidants. The present study evaluated the efficacy of the application of the essential oils of *O. vulgare* L. (OVEO) and *R. officinalis* L. (ROEO) alone and in combinations to inhibit *R. stolonifer* URM 3728, *A. flavus* URM 4540 and *A. niger* URM 5842 on laboratory media and on grapes (*Vitis labrusca* L.) and its influence on the autochthonous mycoflora, physical, physicochemical and sensory characteristics of the fruits during storage at room temperature (25 ° C for 12 days) and chilled (12 ° C for 24 days). The OVEO and ROEO revealed MIC values of 0.25 and 1 µL / ml, respectively, against all fungi tested. The application of essential oils in different concentrations (MIC ROEO 1 µL / ml, MIC OVEO 0.25 µL / mL, ½ MIC OVEO 0.125 L / µL + ½ MIC ROEO 0.5 µL / mL, ¼ CIM OVEO 0.06 µL / mL + ¼ MIC ROEO 0.25 µL / mL) inhibited the mycelial growth (95.18 to 99.46%) and spore germination (> 75%) of the assayed fungi strains in artificially infected grapes as well as the autochthonous mycoflora of grapes stored at both room and cold temperature. In general, the application of a coating composed of OVEO and or ROEO at sub-inhibitory amounts preserved the quality of grapes, which were measured by their physical attributes (color, firmness, weight loss), physico-chemical (acidity, soluble solids and relative acidity / soluble solids) and sensory over time storage evaluated. These results demonstrate the potential of the OVEO and ROEO to control post-harvest pathogenic fungi in fruits, in particular, *R. stolonifer*, *A. flavus* and *A. niger* in table grapes.

Keywords: oregano, rosemary, essential oils, synergism, grapes, post-harvest decay.

LISTA DE TABELAS

APÊNDICE D - ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1	Growth inhibition of <i>R. stolonifer</i> URM 3728, <i>A. niger</i> 5842 URM and <i>A. flavus</i> URM 4540 in liquid medium throughout 7 days of exposure to <i>O. vulgare</i> L. and <i>R. officinalis</i> L. essential oils alone and in different combinations.	70
Table 2	Inhibition of spore germination of <i>R. stolonifer</i> URM 3728, <i>A. niger</i> URM 5842 and <i>A. flavus</i> URM 450 when exposed to <i>O. vulgare</i> L. and <i>R. officinalis</i> L. essential oils alone and in different combinations.	71
Table 3	Mean values of physical and physicochemical quality in grapes cultivar Isabella coated with <i>O. vulgare</i> L. and <i>R. officinalis</i> L. essential oils alone and in different combinations, and stored at room temperature (25 °C) for 12 days.	72
Table 4	Mean values of physical and physicochemical quality in grapes cultivar Isabella coated with <i>O. vulgare</i> L. and <i>R. officinalis</i> L. essential oils alone and in different combinations, and stored at cold temperature (12 °C) for 24 days.	73
Table 5	Mean sensory scores for grapes cultivar Isabella coated with the essential oils from <i>O. vulgare</i> L. and <i>R. officinalis</i> L. alone and in combinations and stored at cold temperature (12 °C).	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT	Acidez titulável
°C	Grau Celsius
C* _{ab}	Croma
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Empasa	Empresa Paraibana de Abastecimentos e Serviços
g	Gramas
h* _{ab}	Ângulo Hue
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
L*a*b*	Sistema CIE <i>Lab</i>
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
µL	Microlitros
N/mm	Newton por milímetro
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
NaOH	Hidróxido de sódio
OV	<i>Origanum vulgare</i> L.
OEOV	Óleo Essencial de <i>Origanum vulgare</i> L.
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Percentual
RO	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.
OERO	Óleo Essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.
SS	Sólidos solúveis
SS/AT	Razão sólidos solúveis por acidez titulável
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE UVAS	16
2.2 CONTROLE DE FUNGOS PATÓGENOS PÓS-COLHEITA	18
2.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS	21
2.4 APLICAÇÃO COMBINADA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E FITOCONSTITUINTES	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 MATERIAIS	28
3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	28
3.3 INFLUÊNCIA SOBRE A MASSA MICELIAL FÚNGICA	29
3.4 INTERFERÊNCIA SOBRE A GERMINAÇÃO DE ESPOROS FÚNGICOS	30
3.5 INFLUÊNCIA SOBRE O CRESCIMENTO FÚNGICO SUPERFICIAL NOS FRUTOS	30
3.6 EFEITO SOBRE O CONTROLE DA DETERIORAÇÃO DOS FRUTOS	31
3.7 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	31
3.7.1 Sólidos solúveis (SS)	32
3.7.2 Acidez tituláveis (AT)	32
3.7.3 Relação SS/AT	32
3.7.4 Perda de massa	32
3.7.5 Cor	33
3.7.6 Firmeza	33
3.8 ANÁLISE SENSORIAL	33
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34

4 REFERÊNCIAS	35
5 APÊNDICES	44
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	44
APÊNDICE B - TESTE DE ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA	45
APÊNDICE C - TESTE DE ORDENAÇÃO-PREFERÊNCIA	46
APÊNDICE D – ARTIGO CIENTÍFICO	47

1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores de frutas no mundo. Nos últimos dez anos, a produção de frutas teve um crescimento em torno de 110%, com um consumo *per capita* de 54kg/ano. (MIRANDA et al., 2012). A fruticultura é uma atividade dinâmica e de forte potencial de crescimento, podendo ser um dos grandes vetores da reversão do quadro de dificuldades econômicas encontrado no Nordeste brasileiro (OLIVEIRA; FARIAS FILHO, 2012). Dentro desse cenário destaca-se a viticultura, que na Região Nordeste, em razão das altas temperaturas na maior parte do ano, apresenta condições diferenciadas para a produção de uvas de mesa (PEREIRA; GAMEIRO, 2008; RIBEIRO et al., 2012).

A uva de mesa ‘Isabel’, uma das principais da variedade *Vitis labrusca* L., possui cachos com bagas bastante aglomeradas e de rápido amadurecimento. Essa variedade de uva de mesa é a mais produzida no Vale do Siriji, Estado da Paraíba, cujas principais causas de perdas reportadas pelos produtores estão relacionadas à excessiva degrana, escurecimento do engaço, incidência de podridões, perda de massa e amolecimento das bagas, além de problemas relacionados às embalagens, ao manuseio e ao transporte (SILVA et al., 2012).

O predomínio da uva Isabel nas regiões tradicionais, assim como sua expansão em novos pólos, decorre de sua facilidade de adaptação às diferentes condições ambientais e à qualidade da uva, originando produtos com tipicidade e boa aceitação no mercado. Essa variedade é utilizada para diversos fins, a citar o consumo na forma *in natura* como uva de mesa, para elaboração de vinhos, vinagres, sucos, doces e geleias (CAMARGO, 2004).

Embora esteja em momento destacável de expansão, alguns segmentos da cadeia produtiva da agricultura brasileira ainda são muito frágeis e pouco estudados, como é o caso das patologias e perdas pós-colheita de frutas. Os patógenos, principalmente, os quiescentes em pós-colheita, têm causado destacáveis transtornos aos atacadistas, varejistas e principalmente aos importadores de frutos, vindo a causar perdas consideráveis e impacto na suficiência da atividade (SENHOR et al., 2009).

Apesar da utilização de fungicidas se constituir em importante estratégia de controle de fungos patógenos pós-colheita, o modo comumente empregado para o seu uso tem se dado através da aplicação de produtos sintéticos (ROJAS-GRAU; SOLIVA-FORTUNY; NIARTIN-BELLOSO, 2008), alguns dos quais têm sido retirados do mercado devido a

possíveis riscos de toxicidade aos consumidores (CALVO et al., 2007). O aumento do interesse público e das autoridades de saúde a respeito da presença de resíduos de fungicidas sintéticos em produtos agrícolas, bem como o possível risco concernente ao acúmulo dessas substâncias no ambiente, têm estimulado a pesquisa de métodos alternativos para o controle de doenças e, conseqüentemente, das perdas pós-colheita em frutos (SILVEIRA et al., 2005; SANTOS et al., 2012).

Nesse contexto, a utilização de substâncias naturais com características bioativas para aplicação como antimicrobianos em alimentos tem se mostrado uma forma promissora como método de conservação. Especial interesse da indústria de alimentos tem sido dado ao potencial da ação de aplicação de óleos essenciais de plantas, devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (RASOOLI; REZAEI; ALLAMEH, 2006; SOUZA et al., 2009; SOUSA et al., 2012). A mistura de concentrações de diferentes óleos essenciais pode se caracterizar em uma maneira de fornecer o equilíbrio entre a eficácia antimicrobiana dos produtos utilizados, e a aceitabilidade sensorial dos alimentos aos quais foram aplicados (AZERÊDO et al., 2011). A dificuldade de seu tratamento/controle e o crescente reconhecimento do impacto das infecções fúngicas na produção de frutos tem estimulado alguns pesquisadores a avaliar o potencial antifúngico de aplicação combinada de óleos essenciais como agentes inibidores do crescimento e sobrevivência de fungos patógenos pós-colheita *in vitro* e em matrizes vegetais (NGUEFACK et al., 2009; CAMELE et al., 2010; CORREA-ROYERO et al., 2010; SHUKLA et al., 2012)

Considerando tais aspectos, o presente estudo avaliou a eficácia da aplicação dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. (orégano) e *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) isoladamente e em combinação em concentrações subletais na inibição do crescimento das cepas dos fungos patógenos pós-colheita *Rizhopus stolonifer* URM 3728, *Aspergillus flavus* URM 4540 e *Aspergillus niger* URM 5842 em meio laboratorial e em uvas de mesa (*V. labrusca* L.) e sua influência sobre a micoflora autóctone, características físicas, físico-químicas e sensoriais dos frutos durante o armazenamento a temperatura ambiente (25 °C por 12 dias) e refrigerada (12 °C por 24 dias).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE UVAS

A uva de mesa ‘Isabel’ é uma das principais cultivares de *Vitis labrusca* L., espécie originária do Sul dos Estados Unidos e de onde foi difundida para outras regiões. A partir da introdução do cultivo da videira no Brasil, muitas regiões brasileiras em diferentes Estados chegaram a experimentar e a desenvolver o cultivo da uva e a produção de vinhos (GUERRA et. al., 2009; MELLO, 2009).

O sistema agroindustrial da uva apresenta significativa importância econômica atualmente, em decorrência dos inúmeros empregos nos setores de insumos para atividade, produção, processamento, distribuição e serviços de apoio. Em 2007 a área mundial destinada ao plantio de uvas representou 7.272.583 hectares, havendo um total produzido de 67,22 milhões de toneladas de frutos (MELLO, 2009). Em se tratando de Brasil, em 2007, o país ocupava a 19ª posição mundial em produção de uvas, referente à produção mundial. No que diz respeito às transações internacionais, o Brasil foi o 11º colocado em quantidade de uvas exportadas e o 7º em valor das exportações de uvas. As exportações brasileiras do setor vitivinícola apresentaram, em 2010, 148,33 milhões de dólares, 11,95% superiores ao ano de 2009. E em relação às importações, no mesmo período estas cresceram 32,91% em quantidade e, 66,27% em valor (MELLO, 2010).

De acordo com os dados estatísticos disponíveis no portal do IBGE, em 2011, houve aumento de 12,97% na produção de uvas no Brasil, sendo a região Sul a maior produtora do país contribuindo com 62% do total reduzido, seguido pela região Nordeste com 21% (EMBRAPA, 2012).

A produção de uvas de mesa no Brasil pode ser dividida em dois grupos: um formado pelas uvas finas de mesa (*Vitis vinifera* L.), representado principalmente por cultivares como a Itália e suas mutações (Rubi, Benitaka e Brasil), Red Globe, Red Meire, Patrícia e as sem sementes (Centennial Seedless, Superior Seedless ou Festival, Thompson Seedless, Perlette, Catalunha e Crimson Seedless); e outro pelas uvas comuns ou rústicas de mesa (*Vitis labrusca* L.), cuja representante principal é a cultivar Niágara Rosada (NACHTIGAL, 2003).

As uvas americanas ou uvas comuns (*Vitis labrusca* L.) caracterizam-se, de acordo com Nachtigal; Camargo e Maia (2005), por apresentarem altos índices de produtividade e resistência superior às doenças fúngicas, em relação às *Vitis vinifera* L., menor custo de produção, portanto, sendo comercializadas por um valor menor que as uvas europeias. As uvas finas ou europeias (*Vitis vinifera* L.) apresentam características próprias para a fabricação de vinhos finos ou de mesa, porém possuem baixa resistência às principais doenças da cultura e, por este fato se torna uma produção com custos mais elevados em decorrência do maior número de tratamentos e aplicações de defensivos.

A uva é um fruto não climatérico, com baixa atividade fisiológica, muito sensível à desidratação e infecção fúngica durante o manuseio na etapa pós-colheita (ARTÉS-HERNÁNDEZ; TOMÁS-BARBERÁN, 2006). Após a colheita e ao longo do armazenamento, os principais problemas das uvas de mesa são a desidratação, o desgrane e as podridões que podem ser amenizadas pelo manejo adequado e cuidadoso das frutas (KUGLE et al., 2002). Algumas desordens são de naturezas fisiológicas, quase sempre ocasionadas durante o armazenamento refrigerado; enquanto outras são provocadas pelo manuseio inadequado das frutas provocando infecções por microrganismos (OLIVEIRA et al., 2006; CAMARGO et al., 2011).

As doenças na pós-colheita de uvas provém de infecções quiescentes ou adquiridas. O processo infeccioso nas infecções quiescentes, geralmente, inicia-se na fase de pré-colheita, quando os frutos ainda se encontram ligados às plantas. Porém, a partir do momento que são colhidos, sofrem alterações fisiológicas, tornando-se, em geral, mais susceptíveis ao ataque de patógenos, que normalmente encontram-se em estado de quiescência (CAVALCANTI et al., 2005). Frequentemente, as infecções quiescentes são causadas por fungos dos gêneros *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Lasiodiplodia* e *Botrytis*. No caso de infecções adquiridas, que ocorrem por ferimentos após a colheita, destacam-se os fungos *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Rhizopus*, que manifestam rapidamente sintomas de podridões (OLIVEIRA et al., 2006). O ataque destes microrganismos aos frutos causa a ocorrência de doenças superficiais, destruição dos tecidos, resultando em redução da sua qualidade e da vida de prateleira, tornando-os menos atrativos ou não comercializáveis (MOSS, 2002).

A ocorrência de doenças fúngicas em cultivares de uvas de mesa pode provocar grandes perdas e tornar-se fator limitante à viticultura, quando medidas adequadas de controle não são adotadas. A suscetibilidade das principais cultivares plantadas, as condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento de patógenos, além do manejo inadequado da

cultura, fazem com que o cultivo da videira só se viabilize com a aplicação maciça de fungicidas, aumentando os custos de produção, os riscos de intoxicação dos trabalhadores e de contaminação do ambiente (NAVES; GARRIDO; SÔNEGO, 2006). Diante disso, novas alternativas tecnológicas de produção e proteção destes frutos devem ser avaliadas e implementadas, caso sejam viáveis de uso, com o objetivo de melhorar a produtividade e qualidade do fruto, minimizando as agressões ao meio ambiente e evitando riscos à saúde humana, além das reduções de perdas pós-colheita.

2.2 CONTROLE DE FUNGOS PATÓGENOS PÓS-COLHEITA

As doenças de plantas são responsáveis por consideráveis perdas para as culturas de importância econômica, encontrando-se, entre elas, as doenças de pós-colheita em vegetais. A perda pós-colheita de alimentos é dita como “aquela que ocorre após a colheita em virtude da falta de comercialização ou do consumo do produto em tempo hábil; ou seja, resultante de danos à cultura, ocorridos após sua colheita, consequente do dano acumulado desde o local de produção, somando-se àqueles ocorridos durante o transporte, armazenamento, processamento e/ou comercialização do produto vendável” (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

As doenças pós-colheita podem iniciar no campo e permanecerem latentes, manifestando-se somente após a colheita em condições ambientais favoráveis. As infecções latentes podem iniciar em qualquer estágio do fruto na planta, ocorrendo a inibição do desenvolvimento do patógeno através de condições fisiológicas impostas pelo hospedeiro, até que o estágio de maturação do fruto tenha sido alcançado e/ou iniciada a respiração climatérica (DANTAS et al., 2003).

As infecções ativas (ou não latentes) ocorrem quando os frutos já iniciaram ou completaram o processo de maturação, progredindo na medida em que as condições ambientais favorecem o crescimento do patógeno. Nessas infecções, a penetração se processa, principalmente, por ferimentos causados durante as operações de colheita, armazenamento e comercialização, embora em alguns casos possa ocorrer mesmo através da superfície intacta do fruto (DANTAS et al., 2003). Mudanças fisiológicas normais do hospedeiro, manuseio incorreto ou condições ambientais adversas podem dar início à transição da fase de latência para a fase ativa, promovendo o desenvolvimento da doença (SILVEIRA et al., 2005).

As doenças ocasionadas por fungos são àquelas que ocorrem com maior frequência durante a fase de pós-colheita de vegetais (CHITARRA; CHITARRA, 2005), sendo responsáveis por 80 a 90% do total de perdas causadas por fitopatógenos (DANTAS et al., 2003). Os vegetais, devido ao seu pH ácido, elevado teor de umidade e composição de nutrientes, são muito susceptíveis à ação de patógenos fúngicos, os quais em soma a sua ação deteriorante, podem tornar os produtos impróprios para o consumo devido à produção de micotoxinas, que podem ter efeitos mutagênicos, teratogênicos ou carcinogênicos aos consumidores quando do consumo crônico (FRISVAD; SKOUBOE; SAMSON, 2005; PRAKASH et al., 2010; PRAKASH et al., 2011; REDDY et al., 2011).

A presença de fungos e consequente atividade metabólica destes agentes são reconhecidas como estando entre as principais causas biológicas primárias de perdas de produtos perecíveis de origem vegetal. Aproximadamente cem mil espécies fúngicas reconhecidas, menos de 10% são fitopatógenos, enquanto que em torno de cem espécies são responsáveis pela maioria das doenças pós-colheita (TRIPATHI; DUBEY, 2004; NGUEFACK et al, 2009).

Penicillium digitatum, *P. italicum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *A. solani*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus flavus* e *A. niger* destacam-se como fungos patógenos pós-colheita (DAFERERA et al., 2003; TZORTZAKIS; EKONOMAKIS, 2007). O ataque destes microrganismos aos vegetais causa a ocorrência de doenças superficiais, destruição dos tecidos, resultando em redução da sua qualidade e da vida de prateleira, tornando-os menos atrativos ou não comercializáveis (MOSS, 2002). Embora seja difícil determinar a total magnitude das perdas pós-colheita devido à deterioração microbiana, as quais variam amplamente de acordo com o tipo de vegetal, área de produção e aspectos sazonais, é sabido que até 25% da produção mundial de vegetais está sujeita ao ataque de microrganismos em países industrializados, enquanto que em países em desenvolvimento este dano é frequentemente mais alto, podendo atingir até 50% da produção (SPADARO; GULLINO, 2004).

Para reduzir estes prejuízos, métodos físicos, químicos e biológicos vêm sendo empregados, visando o controle deste grupo de doenças. O controle químico, pela aplicação de fungicidas sintéticos, permanece sendo a principal medida para reduzir a incidência de doenças pós-colheita em vegetais. Estes compostos podem ser utilizados de forma isolada, combinados em misturas, ou aplicados separadamente em sequência (ISMAIL; ZHANG, 2004). O controle químico de fungos patógenos em vegetais através do amplo uso de

fungicidas sintéticos apresenta significantes desvantagens, incluindo aumentado custo de produção, perigos para os manipuladores, preocupação acerca de resíduos em alimentos, ameaça à saúde pública e ao meio ambiente (FERNANDEZ et al., 2001; SOROUR; LARINK, 2001). Ainda, devido ao surgimento de novas estirpes de fungos fitopatógenos e consequente desenvolvimento de resistência por parte destes microrganismos, muitos dos compostos fungitóxicos sintéticos amplamente empregados estão tornando-se gradualmente menos efetivos (PARANAGAMA et al., 2003).

O amplo uso de fungicidas no mundo é variável, embora seja estimado que anualmente cerca de 23 milhões de quilos destes compostos sejam aplicados em frutas e vegetais, sendo geralmente aceito e difundido pelos produtores, que a produção e mercado de produtos vegetais perecíveis não seriam possíveis sem o seu uso. Carcinogenicidade, teratogenicidade, alta e aguda toxicidade residual, longo período de degradação, poluição ambiental, influência sobre os caracteres organolépticos dos alimentos e efeitos colaterais em humanos são os principais fatores que têm restringido o uso de fungicidas químicos no controle da deterioração pós-colheita (UNNIKRISHNAN; NATH, 2002).

Antifúngicos sintéticos pertencentes ao grupo de benzimidazoles, hidrocarbonetos aromáticos e inibidores da biossíntese do esteroide são frequentemente utilizados como tratamento pós-colheita. Um sério problema relacionado ao uso efetivo destes compostos químicos é o desenvolvimento de resistência por parte dos fungos. A aplicação de crescentes concentrações de agentes químicos como tentativa de superar o problema da resistência fúngica, resulta na presença de altos níveis de resíduos tóxicos nos produtos e no meio ambiente, bem como no aumento da intensidade de seus efeitos colaterais e do custo final de produção (FALANDYSZ, 2000; LEELASUPHAKU et al., 2008). Ainda, os efeitos fitotóxicos e de *off-odour* em vegetais de alguns destes fungicidas tem restringido o seu uso (KAST-HUTCHESON et al., 2001; SOROUR; LARINK, 2001).

A preocupação pública destes riscos tem despertado o interesse na descoberta de protetores de culturas mais seguros com vista à substituição de pesticidas químicos sintéticos. Uma alternativa emergente tem sido o uso de protetores naturais com potencialidade fungitóxica, os quais devem ter baixa toxicidade em mamíferos, menos efeitos deletérios sobre o ambiente e ampla aceitação pública (HAMILTON-KEMP et al., 2000). O uso de métodos não-químicos e de agentes fungicidas não-seletivos pode suprir parte desta necessidade (TRIPATHI; DUBEY, 2004).

O emprego dos chamados fungicidas naturais aparece como mais uma opção ao uso dos fungicidas sintéticos, em termos de eficiência de controle. São alternativas que parecem viáveis em relação ao método químico tradicional, principalmente em função de não deixarem resíduos tóxicos nos produtos tratados (WILSON et al., 1997). O biocontrole, caracterizado como o uso de organismos e/ou seus produtos derivados ou metabólitos para prevenção de doenças em vegetais, é ecologicamente viável, normalmente seguro e pode prover proteção por um longo prazo para a cultura (SAN-LANG et al., 2002; FERNANDO et al., 2005).

Alguns agentes empregados no processo de biocontrole têm se mostrado eficientes como alternativa a fungicidas sintéticos na prevenção da deterioração pós-colheita de vegetais, a citar compostos de aroma (ARCHBOLD et al., 1999; UTAMA et al., 2002), ácido acético (SHOLBERG et al., 1998), glucosinolatos (MARI et al., 2002; MARI et al., 2003), própolis (LIMA et al., 1998), quitosana (CAPDEVILLE et al., 2002; CHOI et al., 2002), extratos vegetais (MOHAPOTRA et al., 2000; TRIPATHI et al., 2002) e óleos essenciais (CHU et al., 2001).

2.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS

As pesquisas atuais têm buscado desenvolver alternativas estratégicas para a redução do uso de aditivos e conservantes químicos na cadeia de produção de alimentos. Neste contexto, a utilização de compostos naturais, como os óleos essenciais, que possuem propriedades antimicrobianas tem surgido como uma opção interessante. A atividade antibacteriana e antifúngica dos óleos essenciais tem por muito tempo sido reconhecida, entretanto a indústria de alimentos tem direcionado maior atenção à sua aplicação como antioxidantes naturais (PLOOY; REGNIER; COMBRINCK, 2009). Os óleos essenciais são reconhecidos por apresentar atividade inibitória frente a uma ampla variedade de microrganismos, incluindo vírus, fungos, protozoários e bactérias (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

Óleos essenciais são obtidos de diferentes partes de plantas, principalmente de folhas, através de vapor ou hidrodestilação; e se caracterizam como uma complexa mistura, principalmente, de terpenóides, monoterpenos e sesquiterpenos, em soma a uma variedade de fenóis aromáticos, óxidos, éteres, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas que determinam o aroma

e odor característico da planta (BATISH et al., 2008). Os compostos e suas porcentagens presentes nos óleos essenciais variam de acordo com a espécie considerada, as condições climáticas, de coleta e extração e as partes da planta utilizadas para a extração (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

A atividade antimicrobiana exercida por terpenos e derivados tem sido descrita através de pesquisas envolvendo diversas espécies de plantas e microrganismos-alvo. Em revisão sobre o assunto, Greay e Hammer (2011) citam alguns dos mecanismos por meio dos quais estes compostos atuam sobre as células bacterianas. Monoterpenos interferem com a integridade e funcionamento da membrana celular, através da mudança de potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória. A exposição a terpenos pode interferir com a expressão de genes codificadores de fatores de virulência, como quando consideradas linhagens de *S. aureus* produtoras de enterotoxinas (QIU et al., 2011); e com a expressão de proteínas citoplasmáticas e de membrana em *Salmonella enterica* (DI PASQUA et al., 2010).

Presença de monoterpenos voláteis ou de óleos essenciais proporciona uma estratégia de defesa importante para as plantas, particularmente contra insetos herbívoros e fungos patogênicos (BATISH et al., 2008). Por serem de fácil extração, biodegradável e facilmente catabolizados pelo meio ambiente, os óleos essenciais não persistem no solo e na água (ISMAN; MACHIAL, 2006), possuem baixa ou nenhuma toxicidade contra peixes, pássaros e mamíferos, e por isso formam a base de muitas aplicações, incluindo aplicação na conservação de alimentos, em produtos farmacêuticos, na medicina alternativa e natural (BAKKALI et al, 2008).

Os óleos essenciais têm atraído interesse científico pelo fato de caracterizarem-se como produtos naturais reconhecidos como GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro), possuir amplo espectro de atividade antimicrobiana, e apresentar eficácia no controle de microrganismos patogênicos e deteriorantes de importância em vegetais (BURT, 2004; OMIDEYGI et al., 2007; GUTIERREZ et al., 2009).

Os óleos essenciais apresentam duas principais características como agentes antimicrobianos de possível uso em alimentos: a) sua origem natural, o que significa mais segurança para os consumidores e para o meio ambiente; e b) são considerados como possuidores de baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana. A segunda característica citada toma como base o fato de que os óleos essenciais são compostos por uma grande variedade de constituintes, os quais, aparentemente, apresentam diferentes

mecanismos de atividade antimicrobiana, tornando, desta forma, mais difícil uma possível adaptação dos microrganismos frente a sua ação (DAFERERA et al., 2003).

Devido ao seu grande número de constituintes, alguns pesquisadores têm sugerido que óleos essenciais não apresentam alvos específicos (CARSON et al., 2002). Acredita-se, que dentre os possíveis mecanismos que utilizam para agir como antimicrobiano seja pela presença em sua constituição de compostos fenólicos, os quais alterariam a bicamada lipídica da membrana celular microbiana, aumentando sua permeabilidade, com posterior liberação de constituintes intracelulares vitais, ou ainda por causar danos em seus sistemas enzimáticos (TURINA et al., 2006). De um modo geral, a ação dos compostos fenólicos sobre os fungos compreende coagulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática, inibição das enzimas fúngicas, distúrbio da funcionalidade do material genético, culminando com a inibição da germinação esporica e do crescimento micelial (BURT, 2004; LIU et al., 2007; MENG et al., 2010).

Os compostos lipofílicos, como aqueles presentes nos óleos essenciais, são eficientemente absorvidos pelas células fúngicas, pois o micélio fúngico apresenta larga natureza lipofílica, associado à grande área relativa superficial em comparação ao seu volume (REGNIER et al., 2008). O mecanismo subjacente à ação antifúngica de óleos essenciais serve como interruptor entre a fase vegetativa e reprodutiva do desenvolvimento dos fungos, visto que são citados por impactar negativamente a esporulação devido ao impedimento do desenvolvimento micelial e/ou da percepção/transdução de diferentes sinais fisiológicos envolvidos na síntese de moléculas do funcionamento da forma vegetativa, com vistas ao desenvolvimento da forma reprodutiva. Como consequência da supressão da produção esporica, resultante da exposição a determinado óleo essencial, ocorre limitação da propagação do patógeno, diminuindo a liberação de esporos para o ambiente (TZORTZAKIS; ECONOMAKIS, 2007).

Estudos anteriores mostraram que os óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. (orégano) e *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) possuem destacáveis propriedades antimicrobianas contra micro-organismos patogênicos contaminantes de alimentos (SOUZA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010). Os óleos essenciais de *O. vulgare* e *R. officinalis* têm mostrado eficiência na inibição de diferentes microrganismos, embora os resultados tenham sido variados de acordo com o microrganismo ensaiado, origem do óleo essencial e técnica utilizada para verificação da atividade antimicrobiana (NOVAK et al., 2000; DUARTE et al., 2005; SOUZA et al., 2007; AFONSO et al., 2008).

Em revisão feita por Porte e Godoy (2001), consta que concentrações de óleos essenciais suficientes para exercerem os efeitos antimicrobianos desejados geralmente são mais elevadas que às utilizadas costumeiramente em alimentos para propósitos flavorizantes. Torna-se ainda relevante destacar que diversos pesquisadores sugerem que a eficácia antimicrobiana dos chamados antimicrobianos naturais, incluindo os óleos essenciais, pode ser minimizada pela presença e interação com alguns constituintes das matrizes alimentares, em especial suas macromoléculas (DORMAN; DEANS, 2000; SOUZA et al., 2009; AZERÊDO et al., 2011; SOUSA et al., 2012). Assim, tem sido admitido que determinados componentes nutricionais, quando em altas concentrações, poderiam proteger os microrganismos contra a ação de componentes presentes nos óleos essenciais, ao mesmo tempo, possibilitar uma reparação mais rápida das células injuriadas devido a maior disponibilidade de nutrientes neste meio, quando comparada aos meios laboratoriais. Outros fatores intrínsecos ao alimento, como conteúdo de potencial de oxido-redução e valor de pH também poderiam interferir em algum grau na ação destes agentes antimicrobianos (HOLLEY; PATEL, 2005). Burt (2004) admite também que alguns fatores extrínsecos ao alimento, como a temperatura do ambiente e/ou características fisiológicas particulares do microrganismo alvo, poderiam também afetar adversamente a eficácia antimicrobiana dos óleos essenciais.

Todos estes aspectos revelam uma necessidade de realização de diversos estudos com foco na atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e de seus componentes, com ênfase e na sua interação com os fatores intrínsecos e extrínsecos aos alimentos, as quais podem interferir de forma a potencializar ou diminuir a inibição dos micro-organismos presentes nos alimentos em decorrência da ação destes agentes antimicrobianos.

2.4 APLICAÇÃO COMBINADA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E FITOCONSTITUINTES

É de fundamental importância se considerar o impacto da aplicação de óleos essenciais sobre as características sensoriais dos produtos alimentícios durante o armazenamento, uma vez que a concentração do óleo essencial necessária para o estabelecimento da eficácia antimicrobiana na matriz alimentar pode resultar em características organolépticas desagradáveis ao consumidor (HSIEH et al., 2001;

GUTIERREZ et al., 2009). Considerando estes aspectos, o uso dos óleos essenciais na inibição do crescimento microbiano em alimentos tem sido objeto de investigação e aperfeiçoamento, visto que estes antimicrobianos naturais também podem, quando aplicados em doses excessivas, exceder os limites da aceitação pelo consumidor, com implicações negativas, principalmente, no sabor e no odor dos produtos (SOUZA et al., 2007).

Sugere-se que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é atribuída a mais de um mecanismo (BURT, 2004; MOREIRA, 2005), de modo que aplicação combinando de óleos essenciais, ou de seus componentes, poderia resultar em uma eficácia aumentada frente a ação contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes de alimentos (GUTIERREZ et al., 2008). Nesse contexto, Burt (2004) relata que um efeito aditivo resultante da aplicação combinada de compostos antimicrobianos ocorre quando a ação combinada é igual à soma dos efeitos individuais; por sua vez, o efeito de sinergismo ocorre quando o efeito das substâncias combinadas é maior do que a soma dos efeitos individuais.

Os efeitos biológicos dos óleos essenciais podem ser resultantes de um sinergismo entre todos os constituintes, ou ainda serem resultados da interação entre seus constituintes majoritários. Geralmente, os constituintes majoritários são responsáveis pelas características biológicas dos óleos essenciais, sendo que os efeitos observados dependem, muitas vezes, da sua concentração no óleo essencial. No entanto, mesmo os constituintes presentes em menores quantidades, ditos minoritários, podem desempenhar efeitos importantes no estabelecimento das atividades biológicas dos óleos essenciais. É provável que os vários constituintes presentes em um óleo essencial desempenhem um efeito importante na determinação da sua fragrância, densidade, textura e coloração e, principalmente, na sua capacidade de penetração e distribuição na célula do agente-alvo (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008).

Outro fator importante a ser ressaltado é que a ação combinada de óleos e/ou de seus constituintes pode potencializar o efeito antimicrobiano, como verificado por Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2008) e Lambert et al. (2001) em estudos com a combinação do óleo essencial de orégano e tomilho. Os resultados encontrados por estes pesquisadores suportam a ideia de que, quando usados em combinação, as concentrações requeridas para o alcance da eficácia antimicrobiana desejada podem ser menores, minimizando assim o impacto sobre os atributos sensoriais de alimentos. Em estudo realizado por Azerêdo et al. (2011) verificou-se efeito sinérgico entre os óleos essenciais de orégano e alecrim, cujos componentes majoritários são, respectivamente, carvacrol e 1,8-cineol, frente à *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica*, e efeito aditivo contra *Pseudomonas*

fluorescens. Apostolidis et al. (2008) verificaram que embora haja um teor mais elevado de fitoquímicos no óleo essencial de orégano quando aplicado isoladamente, a eficácia frente a *L. monocytogenes* ocorreu de forma mais intensa quando o óleo essencial foi aplicado em combinação com o extrato de *cranberry*.

Lv et al. (2011) testaram quatro combinações de óleos essenciais obtidos de diversas especiarias (orégano + manjeriço, manjeriço + bergamota, orégano + *perilla* e orégano + bergamota), sendo que todas as combinações testadas causaram destruição celular dos microrganismos-alvo (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*). Outras combinações de óleos essenciais e/ou fitoconstituintes com outros antimicrobianos também tem já apresentado sucesso na inibição de diversos microrganismos, a citar:

- Óleo essencial de orégano com quitosana, na inibição de *A. niger* e *Rhizopus stolonifer* (SANTOS et al., 2012);
- Óleo essencial de alho com nisina, na inibição de *L. monocytogenes* (ROHANI et al., 2011);
- Óleos essenciais de orégano, gerânio com nistatina, na inibição de *Candida* spp. (ROSATO et al., 2009);
- Óleo de eucalipto e timol com gluconato de clorexidina, na inibição da formação de biofilmes por *Staphylococcus epidermidis* (KARPANEN et. al, 2008);
- Timol com ácido acético utilizando como sanitizante de peito de frango pré-inoculado com *Salmonella* spp. (LU; WU, 2011);
- Óleos essenciais de segurelha e aroeira na redução da contagem de *L. monocytogenes* pré-inoculada em carnes (DJENANE et al., 2011);
- Óleos essenciais de orégano e tomilho; orégano, manjerona, tomilho e sálvia na inibição de *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* (GUTIERREZ et al., 2008); e
- Carvacrol e 1,8-cineol na inibição de *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* e *P. fluorescens* em hortaliças minimamente processadas (SOUSA et al., 2012).

Em estudo realizado por Fu et al. (2007) foi investigado a possível interação entre os óleos essenciais de cravo e alecrim em concentrações subinibitórias, sendo observado que o efeito antimicrobiano foi influenciado não apenas pela proporção entre óleos aplicados, mas foi também, e sobretudo, microrganismo-dependente. Os pesquisadores encontraram efeito

antimicrobiano aditivo contra *S. epidermidis*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Proteus vulgaris* e *P. aeruginosa*; efeito sinérgico frente *Candida albicans* e antagônico para *A. niger*.

O incremento das propriedades fungitóxicas de misturas de óleos essenciais pode se estabelecer devido à ação conjunta de dois ou mais componentes, sendo que tal sinérgismo seria destacável na proteção pós-colheita de frutas e vegetais, uma vez que em soma a inibição inicial causada frente aos fungos patógenos pós-colheita, haveria uma dificuldade no estabelecimento de resistência frente à ação dos agentes aplicados em combinação (TRIPATHI; DUBEY, 2004). Desta forma, segundo Gutierrez (2009) os estudos neste campo devem enfatizar a otimização de combinações de óleos essenciais e de seus componentes com o intuito de obter uma atividade antimicrobiana eficaz, mesmo quando aplicados em baixas concentrações, de forma a não afetar adversamente as propriedades organolépticas e aceitabilidade dos alimentos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Os óleos essenciais de *O. vulgare* (lote OREORG01, densidade a 20 °C: 0,90, índice de refração a 20 °C: 1,47) e *R. officinalis* (lote ROSTUN04, densidade a 20 °C: 0,94; índice de refração a 20 °C: 1,51) foram fornecidos pela Empresa Aromalândia Ind. Com. Ltda. (Minas Gerais, Brasil), sendo os seus parâmetros de qualidade foram descritos em laudo técnico emitido pelo fornecedor.

As uvas de mesa cv. Isabel (*Vitis labrusca* L.) em estágio de maturação comercial foram obtidas na EMPASA (Empresa Paraibana de Abastecimentos e Serviços, João Pessoa, Brasil) pela manhã e selecionadas sem sinais de danos mecânicos e deterioração, padronizadas em pequenos cachos com uvas apresentando tamanho, cor e forma homogêneos.

Cepas dos fungos filamentosos patógenos pós-colheita *Rhizopus stolonifer* URM 3728, *Aspergillus niger* URM 5162 e *Aspergillus flavus* URM 4540, obtidos da Coleção de Culturas da Micoteca do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) foram utilizadas como cepas teste.

Para os ensaios de atividade antifúngica foram utilizados repiques das culturas estoque subcultivadas em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud (Himedia, Índia) incubados a 25-28 °C durante sete dias para suficiente esporulação. Os esporos fúngicos foram colhidos através da adição de solução salina (NaCl 0,85 g/100 mL) estéril no meio de crescimento fúngico, e a suspensão obtida foi filtrada em tripla camada de gaze estéril para retenção dos fragmentos de hifas. Em seguida o número de esporos presentes na suspensão foi determinado através de contagem em câmara de Newbauer. A concentração obtida de esporos foi ajustada com solução salina estéril para prover um inóculo fúngico de aproximadamente 10^6 esporos/mL (RASOOLI; ABYANETH, 2004; RASOOLI; OWLIA, 2005).

3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais foi determinada através da técnica de diluição em caldo. Inicialmente, 1 mL da suspensão fúngica foi inoculado em 4 mL de caldo Sabouraud suplementado com concentração ajustada para 10 mL, em seguida, foi adicionado 5 mL da solução com diferentes concentrações dos óleos essenciais. O sistema foi incubado a 25-28 °C por 72 horas. Ao término do período de incubação, a mais baixa concentração (mais alta diluição) do óleo que não apresentou crescimento fúngico visível foi considerada como a Concentração Inibitória Mínima (SHARMA; TRIPATHI, 2008).

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de determinação da CIM foram escolhidas as diferentes concentrações dos óleos essenciais *O. vulgare* L. (OEOV) e de *R. officinalis* (OERO) isolados e em combinação (CIM OERO 1 µL/mL; CIM OEOV 0,25 µL/mL; $\frac{1}{2}$ CIM OEOV 0,125 µL/mL + $\frac{1}{2}$ CIM OERO 0,5 µL/mL; $\frac{1}{4}$ CIM OEOV 0,06 µL/mL + $\frac{1}{4}$ CIM OERO 0,25 µL/mL) que foram utilizadas nos ensaios de quantificação de massa micelial e germinação de esporos.

3.3 INFLUÊNCIA SOBRE A MASSA MICELIAL FÚNGICA

A avaliação da inibição da massa micelial fúngica (peso seco) foi determinada utilizando-se a técnica do envenenamento do substrato de crescimento (técnica de diluição em caldo). Foram inoculados 10 mL da suspensão fúngica (aproximadamente 10^6 esporos/mL) em frasco Erlenmeyer contendo 90 mL de caldo Sabouraud adicionado das diferentes concentrações dos óleos essenciais, com posterior incubação a 25-28 °C. Após 3, 5 e 7 dias de exposição, a massa micelial obtida foi desidratada em estufa a 60 °C por seis horas, seguida por manutenção a 40 °C por 18 horas adicionais (RASOOLI E ABYANEH, 2004; RASOOLI REZAEI; ALLAMEH, 2006). No experimento controle, a suspensão do fungo filamentosos foi inoculada em caldo Sabouraud sem adição das concentrações dos óleos essenciais. Através da comparação do peso da massa micelial seca da suspensão tratada com os óleos essenciais e do ensaio controle foi obtido o percentual de inibição da massa micelial fúngica nos diferentes intervalos de tempo.

3.4 INTERFERÊNCIA SOBRE A GERMINAÇÃO DE ESPOROS FÚNGICOS

Alíquotas de 0,1 mL de cada solução contendo diferentes concentrações dos óleos essenciais foram misturadas com 0,1 mL da suspensão de esporos fúngicos (10^6 esporos/mL) obtidos de culturas com dez dias de crescimento em ágar Sabouraud a 25-28 °C. Em seguida, 0,1 mL do sistema foi colocado no centro de lâminas de vidro estéreis, sendo em seguida incubadas em câmara úmida a 25-28 °C por 24 horas. Após este período, cada lâmina foi fixada com o corante azul lactofenol algodão e observada sobre microscópio óptico para germinação do esporo. Aproximadamente 200 esporos de cada lâmina foram contados. A efetividade dos óleos essenciais na inibição da germinação dos esporos fúngicos foi observada através da comparação do número de esporos germinados nas soluções adicionadas das concentrações dos óleos essenciais em comparação com o número de esporos germinados no experimento controle, onde a solução destes agentes foi substituída por caldo Sabouraud (FENG; ZENG, 2007).

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de quantificação de massa micelial e germinação de esporos, foram escolhidas as diferentes concentrações do OEOV e do OERO isolados e em combinação (CIM OERO 1 µL/mL; CIM OEOV 0,25 µL/mL; $\frac{1}{2}$ CIM OEOV 0,125 µL/mL + $\frac{1}{2}$ CIM OERO 0,5 µL/mL; $\frac{1}{4}$ CIM OEOV 0,06 µL/mL + $\frac{1}{4}$ CIM OERO 0,25 µL/mL) utilizadas nos ensaios com uvas cv. Isabel.

3.5 INFLUÊNCIA SOBRE O CRESCIMENTO FÚNGICO SUPERFICIAL NOS FRUTOS

As uvas foram mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio (1 % v/v) por 15 minutos, lavadas com água potável, e deixados por 2 horas em contato com o ar para secar. Em seguida, foram imersas em 500 mL de uma solução inóculo (aproximadamente 10^6 esporos/mL) da cepa fúngica teste por um minuto com suave agitação utilizando um bastão de vidro estéril. Após este procedimento, os frutos foram mergulhados em 500 mL de um caldo contendo água destilada estéril adicionada de Ágar bacteriológico (0,2 g/100 mL) e diferentes concentrações dos óleos essenciais através de suave agitação com bastão de vidro durante um minuto. Os frutos foram secos sobre tela de “nylon” para drenagem do líquido excedente e,

acondicionados em recipiente de polietileno com tampa. Após este procedimento, um grupo de frutos foi armazenado a temperatura ambiente (25 °C) e outro sob resfriamento (12 °C). Paralelamente, foi realizado um experimento controle onde as soluções dos óleos essenciais forma substituídas por água destilada estéril. Cada tratamento incluiu 40 frutos, e em diferentes intervalos de tempo de armazenamento (temperatura ambiente 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias; resfriamento 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 dias) os frutos foram examinados para presença de infecção fúngica visível, sendo os resultados expressos como percentual de frutos infectados nos diferentes intervalos de tempo analisados (SANTOS et al., 2012).

3.6 EFEITO SOBRE O CONTROLE DA DETERIORAÇÃO DOS FRUTOS

Inicialmente, as uvas foram mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio (1 % v/v) por 15 minutos, lavados com água potável, e deixadas por duas horas em contato com o ar para secar. Em seguida, as frutas foram imersas durante um minuto nos caldos contendo as diferentes concentrações dos óleos essenciais e postas para secar sobre tela de “nylon” visando drenagem do líquido excedente. Após este procedimento, as frutas foram acondicionadas em recipientes de polietileno com tampa, de modo que um grupo foi armazenado a temperatura ambiente (25 °C), enquanto outro grupo foi armazenado sob resfriamento (12 °C). Paralelamente, foi realizado um experimento controle onde as soluções dos óleos essenciais forma substituídas por água destilada estéril. Cada tratamento incluiu 40 frutos, e em diferentes intervalos de tempo de armazenamento (temperatura ambiente 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias; resfriamento 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 dias) os frutos foram examinados para presença de infecção fúngica visível, sendo os resultados expressos como percentual de frutos infectados nos diferentes intervalos analisados (SANTOS et al., 2012).

3.7 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Nos mesmos intervalos de observação da presença de infecção fúngica, os frutos foram avaliadas quanto à perda de peso e aspectos gerais de qualidade como cor, firmeza, determinação de sólidos solúveis, acidez tituláveis e teor de antocianinas.

3.7.1 Sólidos solúveis (SS)

O teor de sólidos solúveis foi determinado utilizando refratômetro digital modelo HI 96801 (Hanna Instruments, São Paulo, Brasil), sendo os resultados expressos em °Brix (MENG et al., 2008).

3.7.2 Acidez tituláveis (AT)

A acidez titulável foi determinada utilizando fenolftaleína como indicador e solução de NaOH 0,1N sendo os resultados expressos em mmol H⁺/100 g de fruta (MENG et al., 2008).

3.7.3 Relação SS/AT

A relação SS/AT foi realizada a partir da razão teor de sólidos solúveis por teor de acidez titulável (MENG et al., 2008).

3.7.4 Perda de massa

Os frutos foram dispostos em bandejas, de modo que permaneceram separados em proporções iguais (controle e tratamento) para posterior acompanhamento da diferença de

peso final durante o experimento. Os resultados foram expressos em porcentagem, relativo a massa inicial do produto (MENG et al., 2008).

3.7.5 Cor

A cor da casca foi medida em três diferentes posições equatoriais do fruto, através do Sistema *CIELab* ($L^*a^*b^*$); ângulo Hue (h^*_{ab}) e croma (C^*_{ab}) em colorímetro Minolta Modelo CR-300 (Osaka, Japão), de acordo a Comissão Internacional de Iluminação (CIE, 1986).

3.7.6 Firmeza

A determinação da firmeza foi realizada utilizando-se probe (1/8) de 3 mm de diâmetro acoplado ao texturômetro TA-XT2 Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Haslemere, Inglaterra), sendo os resultados expressos em N/mm (CHIEN et al., 2007).

3.8 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial foi realizada após aprovação pelo Comitê de Ética (protocolo nº 360/08), utilizando-se testes afetivos de aceitação (Apêndice B), intenção de compra (Apêndice B) e teste de ordenação-preferência (Apêndice C) com 60 provadores não treinados. A análise foi realizada sob condições controladas de temperatura e iluminação em cabines individuais. Cada provador recebeu três unidades das uvas, submetidas aos diferentes tratamentos, as quais foram servidas em pratos brancos descartáveis codificados com um número de três dígitos aleatórios. As três amostras de uva foram servidas simultaneamente, utilizando um método cego de sequência aleatória, imediatamente após ser retirado do armazenamento refrigerado. Os provadores foram orientados a provar biscoito e água entre as amostras para limpar o paladar. Para a aceitabilidade da aparência, cor, sabor, textura, sabor

residual e avaliação global foi utilizada a escala hedônica estruturada mista de nove pontos variando de um (desgostei muito) a nove (gostei muito). A intenção de compra foi avaliada usando a escala estruturada mista de cinco pontos variando de um (certamente não compraria) a nove (certamente compraria). Para o teste de ordenação-preferência, os provadores foram convidados a escolher a amostra mais e menos apreciada com base em sua avaliação global.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas em triplicata (uma uva da porção apical, uma da porção média e outra do fundo de cada cacho) em três repetições, sendo os resultados expressos como média dos dados obtidos em cada repetição. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se testes de estatística descritiva (média e desvio padrão) e inferencial (ANOVA seguida de Teste de Tukey) para determinação de diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$) entre os tratamentos aplicados utilizando o Software Sigma Stat. 2.03.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, M. S.; SANT'ANA, L.S.; PINTO, J.P.A.N.; XIMENES, B. Atividade antioxidante e antimicrobiana do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em filés de tilápia (*Oreochromis* ssp) salgados secos durante o armazenamento congelado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, p. 94 - 95, 2008.
- APOSTOLIDIS, E.; KWON, Y.I.; SHETTY, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 317 - 24, 2008.
- ARCHBOLD, D. D.; HAMILTON-KEMP, T. R.; CLEMENTS, A. M.; COLLINS RANDY, W. Fumigating 'Crimson Seedless' table grapes with (*E*)-2-hexenal reduces mold during long-term postharvest storage. **Hort Science**, v.34, p.705 - 707, 1999.
- ARTÉS-HERNÁNDEZ, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Modified atmosphere packaging preserves quality of SO₂-free 'Superior seedless' table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 39, p. 146 - 154. 2006.
- AZERÊDO, G.A.; STAMFORD, T. L. M.; NUNES, P. C.; GOMES NETO, N. J.; OLIVEIRA, M. E. G.; SOUZA, E. L. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. **Food Research International**, v. 44, p. 1541 - 1548, 2011.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - a review. **Food Chemistry Toxicology**, v. 46, p. 446 - 475, 2008.
- BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K.; KAUR, S. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, v. 256, p. 2166 - 2174, 2008.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p. 223 - 253, 2004.
- CALVO, J.; CALVENTE, J.; ORELLANO, M. E.; BENUZZI, D.; TOSETTI, M. I. S. Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p.251 - 257, 2007.
- CAMARGO, U. A. 'Isabel Precoce': Alternativa para a Vitivinicultura Brasileira. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, Comunicado Técnico 54, p. 6, 2004.
- CAMARGO, R. B.; PEIXOTO, A. R.; TERAPO, D.; ONO, E. O.; CAVALCANTI, L. S. Fungos causadores de podridões pós-colheita em uvas apirênicas no pólo agrícola de Juazeiro-BA e Petrolina-PE. **Revista Caatinga**, v. 24, p. 15 - 19, 2011.

CAMELE, I.; DE FEO, V.; ALTIERI, L.; MANCINI, E.; DE MARTINO, L.; RANA, G. L. An attempt of postharvest orange fruit rot control using essential oils from Mediterranean plants. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, p. 1515 - 1523, 2010.

CAPDEVILLE, G.; DE WILSON, C. L.; BEER, S. V.; AIST, J. R. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested Red Delicious apple fruit. **Phytopathology**, v.92, p. 900 - 908, 2002.

CARSON C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Malaleuca artemifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p. 1914 - 1920, 2002.

CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 263, 2005.

CHIEN, P.; SHEU, F.; YANG, F. Effects of edible coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. **Journal of Food Engineering**, v.78, p. 225 - 229, 2007.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças**. Editora UFLA, Lavras. p. 783, 2005.

CHOI, W. Y.; PARK, H. J.; AHN, D. J.; LEE, J.; LEE, C. Y. Wettability of chitosan coating solution on Fiji apple skin. **Journal of Food Science**, v.67, p. 2668 - 2672, 2002.

CHU, C.L.; LIU, W.T.; ZHOU, T. Fumigation of sweet cherries with thymol and acetic acid to reduce postharvest brown rot and blue mold rot. **Fruits**, v.56, p. 123 - 130, 2001.

COELHO, A. R.; HOFFMAN, F. L.; HIROOKA, E. Y. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. **Semina: Ciências Agrárias**, v.24, p. 337 - 358, 2003.

CORREA-ROYERO, J.; TANGARIFE, V.; DURÁN, C.; STASHENKO, E.; MESA-ARANGO, A. *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 734 - 741, 2010.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v.22, p. 39 - 44, 2003.

DANTAS, S.A.F.; OLIVEIRA, S.M.A.; MICHEREFF, S.J.; NASCIMENTO, L.C.; GURGEL, L.M.S.; PESSOA, W.R.L.S. Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na Central de Abastecimento do Recife. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 528 - 533, 2003.

DETONI, A. M.; CLEMENTE, E.; BRAGA, G. C.; HERZOG, N. F. M. Uva Niágara Rosada cultivada no sistema orgânico e armazenada em diferentes temperaturas. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v. 25, p. 546 - 552, 2005.

DI PASQUA, R.; MAMONE, G.; FERRANTI, P.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, v.10, p. 1040 - 10409, 2010.

DJENANE, D.; YANGÜELA, J.; MONTAÑÉS, L.; DJERBAL, M.; RONCALÉS, P. Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. **Food Control**, v. 22, p. 1046 - 1053, 2011.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Bacteriology**, v.88, p. 308 - 316, 2000.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; GARCIA, V. L.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p. 305 - 311, 2005.

EMBRAPA -**Vitivinicultura brasileira: Panorama 2011** - ISSN 1808-680, Comunicado115 Técnico - 2012.

FALANDYSZ, J. Residues of hexachlorobenzene in Baltic fish and estimation of daily intake of this compound and pentachlorobenzene with fish and fishery products in Poland. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 9, p. 377 - 383, 2000.

FENG, W.; ZENG, X. Essential oils to control *Alteranaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. **Food Control**, v.18, p.1126 - 1130, 2007.

FERNANDEZ, M.; PICO, Y.; MANES, J. Pesticides residues in Orange from Valencia (Spain). **Food Additives and Contaminants**, v.18, p. 614 - 624, 2001.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982.

FRISVAD, C. J.; SKOUBOE, P.; & SAMSON, A. R. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystine and 3-Omethylsterigmatocystine *Aspergillus rumbelli* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 442 - 453, 2005

FU Y.J.; ZU Y.G.; CHEN L.Y.; SHI X.H.G.; WANG Z.; SUN S. Efferth T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytother Research**, v. 21, p. 989 - 999, 2007.

GREAY, S.J.; HAMMER, K.A. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, v.123, p. 1 - 6, 2011.

GUERRA, C.C; MANDELLI, F.; TONIETTO, J.; ZANUS, M. C.; CAMARGO, U.A. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. EMBRAPA UVA E VINHO, documentos nº 48, Bento Gonçalves, 2009.

GUTIERREZ, J., BARRY-RYAN, C., BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 91- 97, 2008.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, v. 26, p. 142 - 150, 2009.

HAMILTON-KEMP, T.R.; McCRAKEN Jr., C.T.; LOUGHRIM, J. H.; ANDERSON, R. A.; HIDELBRAN, D. F. Effect of some natural volatile on the pathogenic fungi *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. **Journal of Chemical Ecology**, v.18, p. 1083 - 1091, 2000.

HOLLEY, R.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v.22, p. 273 - 292, 2005.

HSIEH, P. C.; MAU, J. L.; HUANG, S. H. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. **Food Microbiology**, v.22, p. 35 - 43, 2001.

ISMAIL, M.; ZHANG, J. Post-harvest citrus diseases and their control outlook. **Pest Management**. v.15, p. 29 - 35, 2004.

ISMAN, M.B., MACHIAL, C.M.. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. In: Rai, M., Carpinella, M.C. (Eds.), Naturally Occurring Bioactive Compounds. **Advances in Phytomedicine**, vol. 3, p. 29 - 44 , 2006.

JARVIS, W.R. Latent infections in pre and postharvest environment. **HortScience**, v. 29, p. 749 - 751. 1994.

KARPANEN, T.J.; WORTHINGTON, T.; HENDRY, E.R.; CONWAY, B.R.; LAMBERT, P.A. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 1031 - 1036, 2008.

KAST-HUTCKESON, K.; RIDER, C. V.; LEBLANC, G. A. The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.20, p. 502 - 509, 2001.

KUGLE, R. A. et al. **Fisiologia e manejo póscolheita de frutas de clima temperado**. Campinas: Livraria e Editora Rural, p. 214, 2002.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J.; NYCHAS, G. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453 - 462, 2001.

- LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEEA, P.; CHUENCHITT, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 113 - 121, 2008.
- LIMA, G.; DE CURTIS, F.; CASTORIA, R.; PACIFICA, S.; DE CICCIO, V. Additives and natural products against postharvest pathogens compatibility with antagonistic yeasts. In: Plant Pathology and Sustainable Agriculture. **Proceedings of the Sixth SIPaV Annual Meeting**, p. 17 - 18, 1998.
- LIU, J.; TIAN, S.; MENG, X.; XU, Y. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, p. 300 - 306, 2007.
- LU, Y.; WU, C. Reductions of *Salmonella enterica* on chicken breast by thymol, acetic acid, sodium dodecyl sulfate or hydrogen peroxide combinations as compared to chlorine wash. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, p. 31 - 34, 2012.
- LV, F.; LIANG, H.; YUAN, Q.; LI, C. *In vitro* antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. **Food Research International**, v. 44, p. 3057- 3064, 2011.
- MARI, M.; LEONI, O.; LORI, R.; CEMBALI, T. Antifungal vapour-phase activity of allyl isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears. **Plant Pathology**, v. 51, p. 231 - 236, 2002.
- MARI, M.; BERTOII, P.; PRATEIIA, G.C. Non-conventional methods for the control of postharvest pear diseases. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 761 - 766, 2003.
- MELLO, C. E. C. A história do vinho no Brasil. **Revista Adega**, ed.61, 2009.
- MELLO, L. M. R. **Atuação do Brasil no mercado vitivinícola mundial – panorama 2010**. Embrapa Uva e Vinho, 2010.
- MENG, X.; LI, B.; LIU, J.; TIAN, S. Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. **Food Chemistry**, v. 106, p. 501 - 508, 2008.
- MENG, X.; YANG, L.; KENNEDY, J. F.; TIAN, S. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 70 - 75, 2010.
- MIRANDA, T. G.; LAFETÁ, B. O.; DESSIMONI-PINTO, N. A. V.; VIEIRA, G. Avaliação de morango em calda. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, p. 307-315, 2012.
- MOHAPOTRA, N. P.; PATI, S. P.; RAY, R. C. *In vitro* inhibition of *Botryodiplodia theobromae* (Pat.) causing Java black rot in sweet potato by phenolic compounds. **Annals of Plant Protection Science**, v. 8, p. 106 - 109, 2000.

- MOREIRA, M.; PONCE, A.; del VALLE, C.; ROURA, S. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT-Food Science and Technology**, v. 38, p. 565 - 570, 2005.
- MOSS, M. O. Mycotoxins review. 1. *Aspergillus* and *Penicillium*. **Mycologist**, v. 16, p. 116 - 119, 2002.
- NACHTIGAL, J. C. **Avanços tecnológicos na produção de uvas de mesa**. X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, Bento Gonçalves, 2003.
- NACHTIGAL, J. C.; CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G. Efeito de reguladores de crescimento em uva apirênica, cv. BRS Clara. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 2, p. 304 - 307, 2005.
- NAVES, R.L.; GARRIDO, L.R.; SÔNEGO, O.R. **Controle de doenças fúngicas em uvas de mesa na região noroeste do Estado de São Paulo**. Embrapa Uva e Vinho, Circular Técnica 68, Bento Gonçalves, RS , Dezembro, 2006.
- NGUEFACK, J.; DONGMO, J. B. L.; DAKOLE, C. D.; LETH, V.; VISMER, H. F.; TORP, J.. Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 151 - 156, 2009.
- NOVAK, J.; CHRISTINA, B.; LANGBEHN, B.; PARK, F.; SKOULA, M.; GORSIOU, Y.; FRANZ, C. M. Ratios of cis- and trans- sabinene hydrate in *Origanum marjorana* L. and *Origanum midrophyllum* (Benthams). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 697 - 704, 2000.
- OLIVEIRA, S. M. A. et al. **Patologia póscolheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 855, 2006.
- OLIVEIRA, C. E. V.; STAMFORD, T. L. M.; GOMES NETO, N. J.; SOUZA, E. L. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, p. 308 - 311, 2010.
- OMIDBEYGI, M.; BARZEGAR, M.; HAMIDI, Z.; NAGHDIBADI, H. Antifungal activity of thyme, summer savory and cloves essential oil against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. **Food Control**, v. 18, p. 1518 - 1523, 2007.
- PARANAGAMA, P. A.; ABEYSEKERA, K. H. T.; ABEYWICKRAMA, K.; NUGALIYADD, L. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 86 - 90, 2003.
- PEREIRA, E.P.; GAMEIRO, A. H. **Sistema agroindustrial da uva no Brasil: arranjos, governanças e transações**. XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Rio Branco/Acre, 2008.

PLOOY, W.; REGNIER, T.; COMBRINCK, S. Essential oil amended coatings as alternatives to synthetic fungicides in citrus postharvest management. **Postharvest Biology and Technology**, v. 53, p. 117 - 122, 2009.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobianas e químicas do óleo essencial. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, p. 193 - 210, 2001.

PRAKASH, B.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; KUMAR, A.; MISHRA, P. K.; & DUBEY, N. K. Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, p. 114 - 119, 2010.

PRAKASH, B., SHUKLA, R., SINGH, P., MISHRA, P. K., DUBEY, N. K., & KHARWAR, R. N. Efficacy of chemically characterized *Ocimum gratissimum* L. essential oil as an antioxidant and a safe plant based antimicrobial against fungal and aflatoxin B1 contamination of spices. **Food Research International**, v. 44, p. 385 - 390, 2011.

QIU, J.; ZHANG, X.; LUO, M.; LI, H.; DONG, J.; WANG, J.; LENG, B.; WANG, X.; FENG, H.; REN, W.; DENG, X. Subinhibitory Concentrations of Perilla Oil Affect the expression of Secreted Virulence Factor Genes in *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, v. 6, p. 16160, 2011.

RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibitory effect of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, v. 15, p. 79 - 483, 2004.

RASOOLI, I.; OWLIA, P. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2851 - 2856, 2005.

RASOOLI, I.; REZAEI, M. B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oil from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, v.17, p. 359 - 364, 2006.

REDDY, K. R. N.; RAGHAVENDER, C. R.; SALLEH, B.; REDDY, C. S.; & REDDY, B. N. Potential of aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus* strains on commercially important food grains. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 161 - 165, 2011.

REGNIER, T.; PLOOW, W. du; COMBRINCK, S.; BOTHA, B.; Fungitocity of *Lippia scaberrima* essential oil and selected terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. **Postharvest Biology and Technology**. v. 48, p. 254 - 258, 2008.

RIBEIRO, T. P; LIMA, M. A. C; ALVES, R. E. Maturação e qualidade de uvas para suco em condições tropicais, nos primeiros ciclos de produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, p.1057-1065, 2012.

ROJAS-GRAU, M. A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; NIARTIN-BELLOSO, O. Effect of natural antibrowning agents on colour and related enzymes in fresh-cut Fuji apples a san alternative to use of ascorbic acid. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 267 - 272, 2008.

- ROHANI, S. M. R.; MORADI, M.; MEHDIZADEH, T.; SAEI-DEHKORDI, S.S.; GRIFFITHS M. W. The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Lwt - Food Science and Technology**, vol. 44, p. 2260 - 2265, 2011.
- ROSATO, A.; VITALI, C.; PIARULLI, M.; MAZZOTTA, M.; ARGENTIERI, M.P.; MALLAMACI, R. *In vitro* synergic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. **Phytomedicine**, v. 16, p. 972 - 975, 2009.
- SAN-LANG, W.; SHIN, I.-L.; WANG, C.-H. ; TSENG, K.-C.; CHANG, W.-T.; TWU, Y.-K.; RO, J.-J.; WANG, C.-L. Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 321 - 328, 2002.
- SANTOS, N. S. T.; AGUIAR, A. J. A. A.; OLIVEIRA, C. E. V.; SALES, C. V.; SILVA, S. M.; SILVA, R. S.; STAMFORD, T. C. M.; SOUZA, E. L. Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). **Food Microbiology**, v. 32, p. 345 - 353, 2012.
- SENHOR, R. F.; de SOUZA, P. A.; ANDRADE NETO, R. C.; MARACAJÁ, P. B.; NASCIMENTO, F. J. Manejo de doenças pós-colheita. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável grupo verde de Agricultura alternativa**, v. 4, p. 00 - 13, 2009.
- SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Isbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Microbiological Research**, v. 163, p. 337-344, 2008.
- SHOLBERG, P. L. Fumigation of fruit with short chain organic acids to reduce the potential of postharvest decay. **Plant Disease**, v. 82, p. 689 - 693, 1998.
- SHUKLA, R.; SINGH, P.; PRAKASH, B.; DUBEY, N.K. Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. **Food Control**, v. 25, p. 27 - 33, 2012.
- SILVA, R. S.; SILVA, S. M.; DANTAS, A. L.; MENDONÇA, R. M. N.; GUIMARÃES, G. H. C. Qualidade de uva 'Isabel' tratada com cloreto de cálcio em pós-colheita e armazenada sob atmosfera modificada. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 34, p. 050 - 056, 2012.
- SILVEIRA, N. S. S., MICHEREFF, S. J.; SILVA, I. L. S. S.; OLIVEIRA, S. M. A. Doenças fúngicas pós-colheita em frutas tropicais: patogênese e controle. **Revista Caatinga**, v. 18, p. 283 - 299, 2005.
- SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 136 - 141, 2012.

SOROUR, J.; LARINK, O. Toxic effects of benomyl on the ultrastructure during spermatogenesis of the earthworms *Eisenia fetida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 50, p. 180 - 188, 2001.

SOUSA, J. P.; AZERÊDO, G. A.; TORRES, R. A.; VASCONCELOS, M. A. S.; CONCEIÇÃO, M. L.; SOUZA, E. L.. Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, p. 145 - 151, 2012.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, p. 409 - 413, 2007.

SOUZA, E. L.; BARROS, J. C. B.; CONCEIÇÃO, M. L.; GOMES NETO, N. J.; & COSTA, A. C. V. Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 387 - 393, 2009.

SPADARO, D.; GULLINO, M. L. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 185 - 194, 2004.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K.; PANDEY, V. B. Kaempferol: the antifungal principle of *Acacia nilotica* Linn. Del. **Journal of the Indian Botanic Society**, v. 81, p. 51 - 54, 2002.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 32, p. 235 - 245, 2004.

TURINA, A. V.; NOLAN, M. V.; ZYGADLO, J. A.; PERILLO, M. A. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, p. 101 - 113, 2006.

TZORTZAKIS, N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, v. 8, p. 253 - 258, 2007.

UNNIRISHNAM, V.; NATH, B. S. Hazardous chemicals in food. **Indian Journal of Dairy Bioscience**, v. 11, p. 155 - 158, 2002.

UTAMA, I. M. S.; WILLS, R. B. H.; BEN-YE-HOSHUA, S.; KUEK, C. In vitro efficacy of plant volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetable decay microorganisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6371 - 6377, 2002.

WILSON, C. L.; SOLAR, J. M.; GHAOUTH, A. E.; WINIEWSKI, M. E. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v. 81, p. 204 - 210, 1997.

APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) Senhor (a)

Esta pesquisa é sobre a utilização de antimicrobianos naturais à base de combinações de óleos essenciais de alecrim e orégano como envoltório de frutos e está sendo desenvolvida por Larissa Lima de Sousa, aluna do Curso de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal da Paraíba, sob a orientação do Prof. Evandro Leite de Sousa.

Os objetivos do estudo são prover informações sobre a utilização combinada de óleos essenciais de alecrim e orégano.

A finalidade deste trabalho é contribuir para o estudo de um mecanismo alternativo de manutenção da qualidade organoléptica e nutricional de vegetais *in natura* com estabilidade de armazenamento, promovendo desta forma o desenvolvimento sustentável (sem agressão ao meio ambiente) e uma possibilidade de incremento da competitividade do agronegócio nacional com a disponibilidade de produtos que venham ao encontro às emergentes demandas dos consumidores brasileiros e do mercado internacional por alimentos com uma imagem mais natural, porém com a conveniência de apresentarem qualidade, inocuidade, identidade e segurança dos produtos finais.

Solicitamos a sua colaboração para a realização de análise sensorial, como também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. Informamos que essa pesquisa não oferece riscos, previsíveis, para a sua saúde.

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido(a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma cópia desse documento.

Assinatura do Participante da Pesquisa
ou Responsável Legal

APÊNDICE B – TESTE DE ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Nome: _____ Idade: _____ e-mail: _____
Fone: _____ Escolaridade: _____ Data: _____

Você está recebendo 05 amostras codificadas de (Uva ‘Isabel’ com combinações de óleo de orégano e de alecrim). Prove-as da esquerda para direita, avalie sensorialmente as amostras de acordo com cada atributo nos quadros e escreva o valor da escala que você considera correspondente à amostra (código) no que diz respeito aos atributos avaliados. Antes de cada avaliação, você deverá fazer uso da água e da bolacha.

- 9 – gostei muitíssimo
- 8 – gostei muito
- 7 – gostei moderadamente
- 6 – gostei ligeiramente
- 5 – nem gostei/nem desgostei
- 4 - desgostei ligeiramente
- 3 – desgostei moderadamente
- 2 – desgostei muito
- 1 – desgostei muitíssimo

ATRIBUTOS	AMOSTRAS (Código)				
Aparência					
Cor					
Aroma					
Sabor					
Sabor residual					
Firmeza					
Avaliação Global					

Agora indique sua atitude ao encontrar estas frutas/vegetais no mercado.

- 5 – compraria
- 4 – possivelmente compraria
- 3 – talvez comprasse/ talvez não comprasse
- 2 – possivelmente não compraria
- 1 – jamais compraria

ATRIBUTOS	AMOSTRAS (Código)				
Intenção de compra					

Comentários: _____

OBRIGADA!

APÊNDICE C - TESTE DE ORDENAÇÃO-PREFERÊNCIA

Nome: _____

Data: _____

Você está recebendo 05 amostras codificadas de (Uva ‘Isabel’ com combinações de óleo de orégano e de alecrim). Por favor, prove as amostras, da esquerda para direita, e ordene-as em ordem decrescente de preferência geral. Espere 30 segundos antes de consumir a próxima amostra e utilize água entre cada avaliação.

	Mais preferida				Menos preferida
Posto	1º Lugar	2º Lugar	3º Lugar	4º Lugar	5º Lugar
Código					

Comentários: _____

Agora, por favor, responda as seguintes questões:

Qual característica sensorial você **mais apreciou** na amostra mais preferida?

Qual característica sensorial você **não apreciou** na amostra menos preferida?

Comentários: _____

OBRIGADA!

APÊNDICE D – ARTIGO CIENTÍFICO

Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic fungi and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (table grapes)

Larissa Lima de Sousa¹, Sonálle Carolina Albuquerque de Andrade¹, Ana Júlia Alves Aguiar Athayde¹, Carlos Eduardo Vasconcelos de Oliveira¹, Camila Veríssimo de Sales¹, Marta Suely Madruga², Evandro Leite de Souza^{1*}

A ser enviado para revista International Journal of Food Microbiology

Fator de Impacto: 3.327

Qualis A1: Área de Nutrição - CAPES

Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic fungi and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (table grapes)

Running Title: Antifungal effects of oregano and rosemary

Larissa Lima de Sousa¹, Sonálle Carolina Albuquerque de Andrade¹, Ana Júlia Alves Aguiar Athayde¹, Carlos Eduardo Vasconcelos de Oliveira¹, Camila Veríssimo de Sales¹, Marta Suely Madruga², Evandro Leite de Souza^{1*}

¹ *Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Science Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

² *Laboratory of Flavour, Department of Food Engineering, Center of Technology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

* Author for correspondence: Evandro Leite de Souza

Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Nutrição

Campus I, 58051-900, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

e-mail: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

Telefone: + 55 83 3216 7807; Fax number: + 55 83 3216 7094

Abstract

This study evaluated the efficacy of the application of the essential oils of *Origanum vulgare* L. (OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. (ROEO) alone and in combination to inhibit *R. stolonifer* URM 3728, *A. flavus* URM 4540 and *A. niger* URM 5842 on fungal growth media and on *Vitis labrusca* L. (table grapes). The influence on the autochthonous mycoflora and the physical, physicochemical and sensory characteristics of the grapes during storage (25 °C, 12 days and 12 °C, 24 days) were also studied. The application of the essential oils in different concentrations (Minimum Inhibitory Concentration - MIC, 1/2 MIC + 1/2 MIC and 1/4 MIC + 1/4 MIC) inhibited the mycelial growth and spore germination of the test fungi and inhibited the growth of the assayed fungi strains in artificially contaminated grapes and the autochthonous mycoflora of grapes stored at both room and cold temperatures. In general, the application of OVEO and/or ROEO at sub-inhibitory amounts preserved the quality of grapes as measured by their physical, physicochemical and sensory attributes throughout the assessed storage time. These results demonstrate the potential of the combination of OVEO and ROEO at sub-lethal concentrations to control postharvest pathogenic fungi in fruits, particularly *R. stolonifer*, *A. flavus* and *A. niger* in table grapes.

Keywords: oregano, rosemary, synergism, grapes, postharvest decay.

1. Introduction

The grape is a highly perishable non-climacteric fruit with reduced shelf life due to a loss of firmness, berry drop, stem discoloration, desiccation and fungal rot (Meng et al., 2008). The reduction of losses resulting from fungal rot is a major goal of postharvest technology for table grapes, which seeks to use safe and effective methods to control contamination and the growth of spoiling fungi (Martínez-Romero et al., 2008). Postharvest decay, which is caused by fungi such as *Rhizopus* and *Aspergillus* species, is the cause of rapid decay of fruits affecting their quality, safety, shelf life and market value (Freire et al., 2012). Therefore, the control of fungal growth and survival is critical to reduce the postharvest loss of table grapes (Santos et al., 2013).

Concern over the negative consumer perception of synthetic fungicides used for many years to solve the problem of fungal decay in fruits and the development of fungicide-resistant strains have provoked researchers to investigate the efficacy of natural compounds against postharvest pathogenic fungi (Santos et al., 2012; Xing et al., 2012). In this context, studies have focused on the essential oils of plants and their compounds with a wide spectrum of antifungal properties. Previous studies have confirmed interesting antimicrobial activity of the essential oils from *Origanum vulgare* L. (OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. (ROEO) against spoilage and pathogenic food-related fungi (Carmo et al., 2008; Mitchell et al., 2010; Abdolahi et al., 2012). It has been reported that OVEO and ROEO appear to have no significant or marginal toxic effects *in vivo* and raise no concerns regarding the possible level of use in foods (Burt, 2004).

Early *in vitro* assays with essential oils and their constituents showed that they had promising antimicrobial properties; however, when applied to food matrices, the amounts required to substantially inhibit microbial growth were often higher than would be

organoleptically acceptable (Azerêdo et al., 2011; Sousa et al., 2012). Considering that these high concentrations are likely to impart a certain flavor and taste to foods, the addition of sub-lethal amounts of essential oils in mixtures may be a way to provide the balance between sensory acceptability and antimicrobial efficacy.

Here we report the investigation of an enhanced antifungal effect when OVEO and ROEO were used in combination against the postharvest fungal pathogens *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* in fungal growth media and in the table grapes cultivar Isabella. The influence of these substances on the autochthonous fungi and some physicochemical and sensory attributes of table grapes during storage at cold and room temperatures was also assessed.

2. Materials and methods

2.1 Materials

The OVEO (Batch OREORG01, density at 20 °C: 0.90, refractive index at 20 °C: 1.47) and ROEO (Batch ROSTUN04, density at 20 °C: 0.94, refractive index at 20 °C: 1.51) were supplied by Aromalândia Ind. Com. Ltda. (Minas Gerais, Brazil), and their quality parameters were described in a technical report issued by the supplier.

Vitis labrusca L. (table grapes cv. Isabella) in commercial maturation stage were obtained from EMPASA (Supplies and Services Company of Paraíba, João Pessoa, Brazil); grapes without signs of mechanical damage and deterioration were selected and standardized in small bunches of grapes showing homogeneous size, color and form.

Rhizopus stolonifer URM 3482, *Aspergillus niger* URM 5162 and *Aspergillus flavus* URM 4540 were obtained from Culture Collection URM (Center for Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil) for use as test microorganisms. For antifungal assays, stock cultures were subcultured in Sabouraud agar (Himedia, India) at 25-28 °C for 7 days for sufficient sporulation.

The fungal spores were collected by adding sterile saline solution (0.85 g/100 mL NaCl) to fungal growth medium and filtering the resulting suspension through a sterile triple-gauze layer to retain hyphal fragments. The number of spores present in the suspension was determined by performing spore counts using a hemocytometer. The spore concentration was adjusted with sterile saline solution to provide a fungal inoculum of approximately 10^6 spores/mL (Rasooli and Owlia, 2005).

2.2 Production of OVEO and ROEO solutions for application on grapes

OVEO and ROEO solutions were obtained by dissolving the substance (80 µL/mL) in Sabouraud broth containing bacteriological agar [0.15 g/100 mL (Himedia, India)] as a stabilizing agent (Bennis et al., 2004). Successive dilutions (1:1) were made using the same broth to obtain solutions of different concentrations (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.06, 0.03 and 0.015 µL/mL).

2.3 Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The MIC of OVEO and ROEO was determined by the broth macrodilution method. Initially, 1 mL of fungal suspension was inoculated in 4 mL of Sabouraud broth (with the concentration adjusted to 10 mL) and 5 mL of the solutions containing different

concentrations of OVEO or ROEO (with concentration adjusted to 10 mL) was added. The system was incubated at 25-28 °C for 7 days, and at the end of the incubation period, the lowest concentration (highest dilution) of each essential oil that exhibited no visible fungal growth was considered the MIC (Sharma and Tripathi, 2008).

2.4 Synergy assays

The assays for the synergy of OVOE and ROEO were carried out by determining the Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index in Sabouraud nutrient broth using the macrodilution method. FIC was calculated as follows: MIC of the combination of the essential oil/MIC of the essential oil alone. The essential oils were combined at MIC + MIC; MIC + 1/2 MIC; MIC + 1/4 MIC; MIC + 1/8 MIC; 1/2 MIC + 1/2 MIC; 1/2 MIC + 1/4 MIC; 1/2 MIC + 1/8 MIC; 1/4 MIC + 1/4 MIC; 1/4 MIC + 1/8 MIC; and 1/8 MIC + 1/8 MIC. Synergy was $FIC \leq 0.5$; addition or indifference was $FIC > 0.5$ to 4; and antagonism was $FIC > 4$ (Azêredo et al., 2011; Sousa et al., 2012).

Based on the results of synergy, the concentration of OVEO and ROEO alone and combined at sublethal concentrations were chosen (CIM OVEO; CIM ROEO; 1/2 CIM OVEO + 1/2 CIM ROEO; 1/4 CIM OVEO + 1/4 CIM ROEO) for use in assays of mycelial mass quantification, spore germination assays and application on grapes.

2.5 Effects on fungal mycelial growth

Inhibition of fungal mycelial growth (dry mass weight) was determined with the poisoned growth substrate technique (dilution in broth) by inoculating 10 mL of each fungal suspension (approximately 10^6 spores/mL) in 90 mL of Sabouraud broth supplemented

with different amounts of OVEO and ROEO alone or in combinations and incubated at 25-28 °C. After 3, 5 and 7 days of exposure, the mycelial mass was obtained dried in an oven at 60 °C for 6 h and kept at 40 °C for an additional 18 h (Rasooli and Abyaneh, 2004). In the control experiment, the fungal suspension was inoculated in Sabouraud broth without OVEO or ROEO. By comparing the weights of the dry mycelial masses from the suspension treated with OVEO and/or ROEO and the test control, the percentage inhibition of the fungal mycelial mass at the different time intervals was obtained.

2.6 Effects on fungal spore germination

Aliquots of 0.1 mL of each solution containing different amounts of OVEO and ROEO alone or in combinations were mixed with 0.1 mL of each fungal spore suspension (approximately 10^6 spores/mL) obtained from cultures grown for 10 days on Sabouraud agar at 25-28 °C. Then, 0.1 mL of the mixture was placed at the center of a sterile glass slide and incubated in a moist chamber at 25-28 °C for 24 h. After this period, each slide was fixed with lactophenol cotton blue stain, and spore germination was observed by light microscopy. Approximately 200 spores were counted on each slide. The efficacy of spore germination inhibition was evaluated by comparing the number of germinated spores in the media supplemented with OVEO and or ROEO with those obtained in the control assay, in which the solutions of the essential oils were replaced by Sabouraud broth (Feng and Zeng, 2007).

2.7 Effects on fungal growth on grapes

Grapes were immersed in sodium hypochlorite solution (1 mL/100mL) for 15 min, washed with potable water and left for 2 h in a safe cabinet to dry. The grapes were first

immersed in 500 mL of an inoculum solution (approximately 10^6 spores/mL) of the test fungal strain for one min with gentle stirring using a sterile glass stem. Then, the fruits were immersed in 500 mL of the solution of the essential oils alone or in combination with gentle stirring using a glass stem for one min. The grapes were dried on a nylon filter to drain the excess liquid and packed in a polyethylene container with lid. Then, one group of fruits was stored at room temperature (25 °C), while the other was stored at a cold temperature (12 °C). In addition, a control experiment was performed in which the essential oil solutions were replaced by sterile distilled water. Each treatment included 40 fruits; at different storage time intervals (room temperature 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 days; cold temperature 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 and 24 days), the fruits were examined for the presence of visible fungal infection, and the results were expressed as the percentage of fruit infected at different time intervals (Feng and Zeng, 2007; Liu et al., 2007).

2.8 Effects on fruit decay

Grapes were first immersed in sodium hypochlorite solution (1 % v/v) for 15 min, washed with potable water and left for 2 h in contact with air to dry. Then, the fruits were immersed for three minutes in the solutions containing the essential oils alone or in combination and gently stirred using a glass stem for one min. The fruits were dried on a nylon filter to drain the excess liquid and packed in a polyethylene container with a lid. After this procedure, one group of fruits was stored at room temperature (25 °C) while the other group was stored at a cold temperature (12 °C). In addition, a control experiment was performed in which the essential oil solutions were replaced by sterile distilled water. Each treatment included 40 fruits and different storage times (room temperature 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 days; cold temperature 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 and 24 days). The fruits were examined for

the presence of visible fungal infection, and the results were expressed as the percentage of fruit infected at different times (Feng and Zeng, 2007; Liu et al., 2007).

2.9 Physical and physicochemical analyses

The fruits were evaluated for weight loss and general quality aspects such as color, firmness, soluble solids, titratable acidity and soluble solids/titratable acidity ratio (SS/TA ratio) at the same observation intervals as the examination for fungal infection. The soluble solids (SS) content was determined with a digital refractometer (Model HI 96801, Hanna Instruments, São Paulo, Brazil), and the results were expressed as °Brix (Meng, 2008). The titratable acidity (TA) was determined with phenolphthalein as an indicator with 0.1 N NaOH, and the results were expressed as mmol H⁺/100 g of fruit (Meng, 2008). The SS/TA ratio was determined based on the relationship between soluble solids content and titratable acidity (Meng et al., 2008). The weight loss of fresh table grapes in each treatment during storage was measured by monitoring the weight of the fruit at different intervals. Weight loss was calculated as the percentage loss of initial weight (Meng et al., 2008). The skin color was measured at three different equatorial positions of the fruit with the CIE*Lab* system (L * a * b *). Hue angle (h^*_{ab}) and chroma (C^*_{ab}) were measured in a Minolta colorimeter Model CR-300 (Osaka, Japan), as prescribed by the International Commission on Illumination (CIE, 1986). The firmness determination was performed with a 3-mm-diameter probe (1/8) coupled to a TA-XT2 Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Haslemere, UK), and the results were expressed as N/mm (Chien et al., 2007).

2.10 Sensory analysis

Grapes treated with OVEO and ROEO alone and in combinations were submitted to acceptance and preference tests throughout the 12 days of storage at cold temperature (to ensure the microbiological safety of samples offered to the panelists) using affective acceptance and preference tests with 60 untrained tasters. Sensory analysis was performed after approval by an Ethics Research Committee (protocol 360/08). The analysis was performed under controlled temperature and lighting conditions in individual booths. Each panelist received three units of grapes submitted to the different treatments, which were served on disposable white plates coded with a random three-digit number. The 3-grape samples were served simultaneously with a blind method of random sequence immediately after removal from cold storage. Tasters were asked to eat a salty biscuit and drink water between samples to avoid an aftertaste. For the preference test, tasters were asked to choose the most and least appreciated sample based on their overall evaluation. The intent to purchase was assessed with a five-point structured hedonic scale ranging from one (certainly would not buy) to five (certainly would buy). For the acceptability of appearance, color, flavor, texture, aftertaste and overall assessment, a nine-point structured hedonic scale was used, ranging from one (dislike very much) to nine (liked very much).

2.11 Statistical analysis

All analyses were performed in triplicate (one grape from the apical portion, one from the middle portion and one from the bottom of each cluster) in three replicates, and the results were expressed as the mean of the data obtained in each replicate. Statistical analyses were performed with descriptive statistics (mean and standard deviation) and inferential tests (ANOVA followed by Tukey's test) to determine statistically significant differences ($P < 0.05$) between treatments with Sigma Stat software 2.03.

3. Results

3.1 *In vitro* antifungal effects

OVEO and ROEO exhibited MIC values of 0.25 and 1 $\mu\text{L/mL}$, respectively, against *R. stolonifer* URM 3482, *A. niger* URM 5162 and *A. flavus* URM 4540. FIC indices for the combined application of OVOE and ROEO were 0.5 for all tested fungi strains, suggesting a synergic interaction of the assayed compounds against these fungi. The essential oils inhibited the growth of fungi tested when applied up to a combination of 1/4 OVOE + 1/4 ROEO. Synergy occurs when the essential oils are applied in combination, even in smaller quantities, and the combination presents an activity higher than the application of either essential oil alone. Test strains were capable of growth at sub-lethal concentrations (1/2 MIC, 1/4 MIC) of both essential oils when applied alone.

Regarding the results of synergy, different concentrations of OVEO and ROEO were chosen (OVEO 0.25 $\mu\text{L/mL}$; ROEO 1 $\mu\text{L/mL}$; OVEO 0.12 $\mu\text{L/mL}$ + ROEO 0.5 $\mu\text{L/mL}$; OVEO 0.06 $\mu\text{L/mL}$ + ROEO 0.25 $\mu\text{L/mL}$) for use alone or in combination in assays of mycelial growth and spore germination inhibition and application on grapes. Over 7 days of incubation, the OVEO and ROEO alone and in combinations strongly inhibited (95.18 –99.46 %) the growth of the test fungal strains when compared to the control assays (Table 1). The application of OVOEO and ROEO alone and in the different tested combinations also strongly inhibited spore germination of the assayed fungi (Table 2). The spore germination inhibition of the test strains in all assayed essential oil concentrations was greater than 75 % compared to the number of spores germinated in the control test.

3.2 Antifungal effects on fruits

When OVEO and ROEO alone at MIC and in combinations at sub-lethal concentrations were applied to cover grapes artificially contaminated with spores of *A. flavus* and *A. niger*, the rate of fungal growth was delayed relative to the control experiment throughout the assessed storage period at both room (12 days) and cold temperatures (24 days). Fruits coated with OVEO and ROEO alone stored at low temperature (12 °C) and contaminated with *A. flavus* showed visible fungal growth only from the 18th and 15th day of storage, respectively. Grapes stored at low temperatures and coated with both tested combinations of OVEO and ROEO showed visible growth of *A. flavus* from the 18th day of storage (25 % of fruits were infected). Fruits infected with *A. flavus* and treated with both the tested combinations of essential oils and stored at room temperature presented visible growth from the 8th day of storage (35 % of fruits were infected).

The growth of *A. niger* on fruits coated with OVEO alone and stored at cold temperature was visible from the 10th day of storage (35 % of fruits were infected), and 40 % of fruits were infected on the 12th day of storage. The growth of *A. niger* on grapes coated with the combinations of 1/2 MIC of OVEO + 1/2 ROEO and 1/4 MIC OVEO + 1/4 MIC ROEO and stored at room temperature was visible from the 8th (25% of fruits were infected) and 10th day of storage (35 % of fruits were infected), respectively, and reached 45 % of fruits on the 12th day of storage.

The application of ROEO alone at MIC was less effective in inhibiting the growth of *A. flavus* (visible growth from the 15th and 4th day of storage at low temperature and room temperature, respectively) and *A. niger* (visible growth from the 12th and 8th day of storage at low temperature and room temperature, respectively) on grapes relative to the inhibitory effects caused by the application of OVEO alone and by the tested combinations of OVEO

and ROEO. The infection rate by *A. flavus* and *A. niger* in grapes treated with the tested combinations of OVOE and ROEO and stored at room and cold temperatures was greater than 65 % at the end of the storage period. The control treatments demonstrated fungal growth from the 4th and 12th day of storage at room and cold temperatures for *A. flavus* and *A. niger*, respectively; 100 % of fruits were infected at the end of the storage period at room temperature, and 75 % were infected at cold temperature.

The application of OVEO and ROEO alone and in combination at sublethal amounts inhibited the native fungal population of fruits because visible signs of infection were visible from the 8th (40 % of fruits were infected) and 15th (35 % of fruits were infected) day of storage at room and cold temperature, respectively. Grapes not coated with the essential oils showed visible signs of fungal infection from the 6th (55 % of fruits were infected) and 12th (60 % of fruits were infected) day of storage, respectively.

3.4 Effects on physical and physicochemical characteristics of grapes

The physical and physicochemical changes in grapes uncoated or coated with OVEO and ROEO alone and in combinations were evaluated during storage at room (25 °C) and cold temperatures (12 °C) (Tables 3 and 4). At most of the evaluated storage intervals, no differences ($P > 0.05$) in the firmness of grapes coated and not coated with the essential oils and stored at both cold and room temperature were found. The levels of titratable acidity and soluble solids of grapes coated with OVEO and ROEO alone or in combination and stored under room or cold temperature were equal ($P > 0.05$) to the values found for the control experiment during all assessed storage intervals. Grapes submitted and not submitted to treatments with the essential oils and stored at room temperature presented higher values in

titratable acidity during the first few days of storage, while during the later storage days, the values for titratable acidity were lower.

Grapes submitted and not submitted to treatment with OVEO and ROEO alone and in combination presented similar values ($P > 0.05$) for soluble solids at any of the assessed storage intervals at room and cold storage temperatures; the same was found for weight loss (weight losses approximately 25 % at the final of the storage time; data not shown). For the longest storage time intervals, at both room and cold temperature, the SS/TA ratios for grapes coated with OVEO and or ROEO were equal to ($P > 0.05$) that found for the control experiment. Grapes submitted and not submitted to treatments with the essential oils increased ($P < 0.05$) the values for SS/TA ratios at later storage intervals at both tested storage temperatures.

The color of grapes coated and not coated with the essential oils alone or in combination was predominantly purple at the different storage intervals at both tested temperatures because the values of a^* and b^* (positive values close to zero) did not differ ($P > 0.05$) between the fruits. Furthermore, in all treatments, there was a decrease ($P < 0.05$) in h^* values and a concomitant increase in the C^* value, revealing a color change from blue to purple in the fruits and a maintenance of the fruits' brightness, which was identified from the reading in L^* .

3.5 Effects on the sensory characteristics of grapes

Grapes treated and untreated with OVEO and ROEO alone and in combinations were submitted to acceptance and preference tests throughout the 12 days of storage at cold temperature. Grapes treated and not treated with the essential oils received

similar scores ($P > 0.05$) for all sensory attributes at time zero, with the exception of aftertaste. Scores related to the color and firmness of grapes coated with the essential oils alone and in combination (“neither liked nor disliked” to “like moderately”) did not differ ($P > 0.05$) from the control experiment (“like moderately”). Scores related to the appearance of grapes covered with the combination of $\frac{1}{4}$ MIC of the essential oils and in the control experiment were higher ($P < 0.05$) than those found for grapes treated with the essential oils alone or in combination and $\frac{1}{2}$ MIC only on the 6th day of storage. Scores for appearance and color always corresponded to “liked slight” or “liked moderately.” No differences ($P > 0.05$) were found for appearance and color of grapes covered and not covered with the essential oil over the storage period.

For the attributes aroma, flavor and aftertaste the highest scores ($P < 0.05$) were found for the control grapes (“neither liked nor disliked” to “like moderately”), with the exception of the scores for taste and aftertaste in fruits covered with $\frac{1}{4}$ OVEO + $\frac{1}{4}$ ROEO on the 12th day of storage (“neither liked nor disliked”), which were similar ($P > 0.05$) to those given to the control grapes. In general, the scores for the flavor of grapes covered with the essential oils alone and in combinations increased during the assessed storage period in contrast to a decrease in the scores found for taste during the same period.

For overall evaluation, higher scores on the 6th day of storage were found for the control experiment (“like moderately”); however, the scores for grapes covered with the combination of $\frac{1}{4}$ MIC OVEO + $\frac{1}{4}$ MIC ROEO (“like moderately”) were similar to those found for the control experiment (“like moderately”) on the 12th day of storage. No clear effects of the storage time were found on the attributes of aftertaste, firmness and overall evaluation of the grapes covered and not covered with essential oils.

When asked to report about the intent to purchase, the panelists reported differences between fruits treated and not treated with OVEO and ROEO alone and in combination. For fruits not treated with the essential oils, the responses were generally “purchase,” while for fruits treated with the essential oils alone or in combination, the responses were “maybe would purchase/maybe would not purchase” at all of the assessed storage periods. The results of the preference test showed that the control experiment was the most accepted at the zero time and the 6th day of storage followed by grapes covered with the mixture of 1/4 MIC OVEO + 1/4 MIC ROEO. However, on the 12th day of storage, the fruits covered with 1/4 MIC OVEO + 1/4 MIC ROEO were the most accepted followed by the control experiment and grapes covered with 1/2 MIC OVEO + 1/2 MIC ROEO. Grapes covered with OVOE or ROEO alone were the least preferred for all assessed storage periods.

4. Discussion

The efficacy of the combined use of OVEO and ROEO at sublethal concentrations in inhibiting the survival of some pathogenic postharvest fungi and autochthonous mycoflora associated to table grapes was assessed in this study. The combined application of OVOE and ROEO at different sublethal concentrations inhibited the growth in fungal growth media and the germination of spores of *R. stolonifer*, *A. flavus* and *A. niger*. The strong, rapid and consistent antifungal effect resulting from the combined application of OVEO and ROEO in combination at sublethal amounts suggests an enhanced antifungal effect resulting from the combined application of these compounds.

The highlighted inhibition of spore germination caused when the tested fungi were exposed to the mixtures of OVEO and ROEO is an interesting finding because the spore is known to be an important structure for the survival and spread of fungi (Rabea et al., 2009);

therefore, the application of compounds that strongly inhibit spore germination or cause the destruction of these structures are interesting candidates for the control of spore populations and spreading on various substrates or environments (Plascencia-Jatomea et al., 2003; Sharma and Tripathi, 2008). In a previous study, the combination of chitosan and OVEO at sublethal amounts caused significant morphological changes in spores (wilting, disruption, loss of cellular material and deepening of ridges) and mycelia (thinning, wrinkling and loss of cytoplasmic material) of *R. stolonifer* and *A. niger* (Santos et al., 2012). The authors suggested that the mechanism by which chitosan and OVEO inhibited spore germination resulted from their interaction with the cell wall of spores.

The application of the OVEO and ROEO at sublethal concentrations (1/4 MIC + 1/4 MIC; 1/2 MIC + 1/2 MIC) resulted in similar or greater inhibition of *R. stolonifer*, *A. flavus* and *A. niger* on grapes and of the autochthonous mycoflora relative to the effects caused by the application of both essential oils alone, suggesting a synergistic antifungal effect of OVEO and ROEO. The synergy of OVEO and ROEO against postharvest pathogenic fungi has not been previously reported. Azerêdo et al. (2011) found a synergistic effect of the combined application of OVEO and ROEO against the bacteria associated with minimally processed vegetables, *Listeria monocytogenes*; *Yersinia enterocolitica*; and *Aeromonas hydrophilla*, and an additive effect against *Pseudomonas fluorescens*. According to these authors, the increased antimicrobial activity caused by the mixture of OVEO and ROEO could be partially explained by considering the different compounds found in each essential oil. It is reasonable to hypothesize that a combination of essential oils with similarly structured compounds may exhibit an additive rather than synergistic effect.

Generally, essential oils possessing the strongest antimicrobial properties contain high amounts of carvacrol and or thymol, such as the OVEO (carvacrol, 66.9%) assayed in

this study (Azêredo et al., 2011). The authors also suggested that that hydroxyl groups enhance the antimicrobial properties of essential oils; therefore, 1,8-cineole, which is the most prevalent compound in the ROEO assayed in this study (32.2 %; Azêredo et al., 2011), may also contribute to the establishment of the fast and steady antimicrobial effect achieved with the combination of the essential oils. In another study, Sousa et al. (2012) also found a synergistic effect of carvacrol and 1,8-cineole against *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *A. hydrophilla* and *P. fluorescens*.

Minor components found in essential oils may also have a critical role in the establishment of the synergistic antimicrobial effect of OVEO and ROEO (Gutierrez et al, 2009). Accordingly, hydrocarbons (such as α -pinene, camphene, myrcene, α -terpinene and *p*-cymene), which are known to possess very weak antimicrobial properties, found in ROEO (Azêredo et al., 2011) in amounts higher than 1% appear to swell microbial cells, therefore enabling carvacrol to be more easily transported into the cell (Gutierrez et al., 2008).

Previous studies reported the efficacy of some essential oils in significantly inhibiting the growth of postharvest pathogenic fungi (Xing et al., 2012; Omidbeygi et al., 2007). Carmo et al. (2008) and Mitchell et al. (2010) reported the inhibition of *Aspergillus* species (*A. parasiticus*, *A. terreus*, *A. flavus* and *A. ochraceus*) by OVEO (0.6 - 80 μ L/mL) for 14 days at 25 °C. Santos et al. (2012) reported a strong inhibitory effect of the application of chitosan (5 and 2.5 mg/mL) and OVEO (2.5 and 1.25 μ L/mL) at sub-lethal amounts toward *R. stolonifer* and *A. niger* in artificially infected table grapes as well as of the autochthonous mycoflora of table grapes stored at both room and cold temperatures. Freire et al. (2012) observed a strong inhibitory effect on the growth of various postharvest pathogenic fungi (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Colletrichum gloesporioides* and *C. musae*) by *Mentha*

piperita essential oil (0.1 and 0.2 mL/100 mL). Menthone, neo-menthol and carvone were identified as the major fungitoxic compounds of this essential oil.

Taking into account that the physical, physicochemical and sensory parameters of fruits are the essential characteristics of general quality that influence their shelf life and acceptance by consumers, this study assessed the effects that OVEO and ROEO alone and in combination at sublethal amounts had on these attributes in table grapes at room temperature and in cold storage. In agreement with the results obtained in this study, other studies have also reported that the application of essential oils or their compounds alone or in combination preserved or improved the physical and physicochemical quality of fruits and vegetables (Sánchez-González et al., 2011; Hassani et al., 2012; Azerêdo et al., 2011; Sousa et al., 2012; Santos et al., 2012) and preserved the sensory aspects throughout the low-temperature storage period (Abdolahi et al., 2010, Xiao et al., 2010, Xing et al., 2011). These data show that the combination of OVEO and ROEO at sub-lethal concentrations could be considered as an alternative to the sensory impact, particularly to flavor and taste, resulting from the application of essential oils alone at higher concentrations on fruits.

To the best of our knowledge, the findings of this study demonstrate for the first time that the application of OVOE and ROEO in combination at different sublethal concentrations can inhibit the growth of some postharvest pathogenic fungi and the native mycoflora on table grapes stored at room and cold temperatures. Furthermore, the combined application of the tested substances did not negatively affect the physical, physicochemical or sensory aspects of the grapes during the storage period. These results reveal the potential efficacy of the combined application of OVEO and ROEO at sublethal amounts to control the growth and survival of pathogenic fungi in fruits, particularly *A. flavus*, *A. niger* and *R.*

stolonifer in grapes, which may be an interesting alternative to synthetic antifungal agents that are currently applied to reduce postharvest losses caused by these postharvest pathogens.

Acknowledgments

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development - CNPq (Brazil) and Ministry for Agricultural, Feedstock and Supply (Brazil) for financial support (Proc. 578072/2008-4) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - CAPES (Brazil) for the scholarship given to L.L. de Sousa.

References

- Abdolahi, A., Hassani, A., Ghosta, Y., Bernousi, I., Meshkatsadat, M.H., 2010. Study of the potential use of essential oils for decay control and quality preservation of Tabarzeh table grape. *Journal of Plant Protection Research* 50, 45-52.
- Azerêdo, G.A., Stamford, T.L.M., Nunes, P.C., Neto, N.J.G., Oliveira, M.E.G., Souza, E.L., 2011. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International* 44, 1541-1548.
- Bennis, S., Chami, F., Chami, N., Bouchikhi, T., Remmal, A., 2004. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology* 28, 454-458.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253.
- Carmo, E.S., Lima, E.O., Souza, E.L., 2008. The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibit the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Food Microbiology*, 39, 362-367.

Chien, P.-J., Sheu, F., Lin, H.-R., 2007. Coating citrus (*Murcott tangor*) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. *Food Chemistry* 100, 1160 – 1164.

CIE - Commission Internationale de l'Éclairage, 1986. *Colourimetry*. (2th ed.) Vienna: CIE publication.

Feng, W., Zeng, X., 2007. Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. *Food Control*, 18, 1126-1130.

Freire, M. M., Jham, G. N., Dhingra, O. D., Jardim, C. M., Barcelos, R. C., Valente, V. M. M., 2012. Composition, antifungal activity and main fungitoxic components of the essential oil *Mentha piperita* L. *Journal of Food Safety* 32, 29-36.

Gutierrez, J., Bourke, P., Lonchamp, J., Barry-Ryan, C., 2009. Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 195-202.

Hassani, A., Fathi, Z., Ghosta, Y., Abdollahi, A., Meshkatalasadat, M. H., Marandi, R. J., 2012. Evaluation of plant essential oils for control of postharvest brown and gray mold rots on apricot. *Journal of Food Safety* 32, 94-101.

Liu, J., Tian, S., Meng, X., Xu, Y., 2007. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* 44, 300-306.

Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valverde, J. M., Bailén, G., Zapata, P., Serrano, M., Castillo, S., Valero, D., 2008. Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. *International Journal of Food Microbiology* 115, 144-148.

Meng, X., Li, B., Liu, J., Tian, S., 2008. Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry* 106, 501-508.

Mitchell, T.C., Stamford, T.L.M., Souza, E.L., Lima, E.O., Carmo, E. S., 2010. *Origanum vulgare* L. essential oil as inhibitor of potentially toxigenic *Aspergilli*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 30, 755-760.

Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z., & Naghdibadi, H., 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and cloves essential oil against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control* 18, 1518-1523.

- Plascencia-Jatomea, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M. M., Shirai, K., 2003. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecular Bioscience* 3, 582-586.
- Rabea, I.E., Badawy, M.E.I., Steurbaut, W., Stevens, C.V., 2009. In vitro assessment of N-(benzyl) chitosan derivate against some plant pathogenic bacteria and fungi. *European Polymer Journal*, 45, 237-245.
- Rasooli, I., Abyaneh, M. R., 2004. Inhibitory effect of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control* 15, 479-483.
- Rasooli, I., Owlia, P., 2005. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry* 66, 2851-2856.
- Sánchez-González, L., Chafer, M., Chiralt, A., González-Martínez, C., 2010a. Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate Polymers* 82, 277-283.
- Santos, N.T.S., Athayde, A.J.A.A., Oliveiram C.E.V., Sales, C.V., Silva, S.M., Silva, R.S., Stamford, T.C.M., Souza, E.L., 2012. Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). *Food Microbiology* 32, 345-353.
- Sharma, N., Tripathi, A., 2008. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research* 163, 337-344.
- Sousa, J.P., Azerêdo, G.A., Torres, R.A., Conceição, M.L., Vasconcelos, M.A.S., Souza, E.L., 2012. Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 158, 9-13.
- Xiao, C., Zhu, L., Luo, W., Song, X., Deng, Y., 2010. Combined action of pure oxygen pretreatment and chitosan coating incorporated with rosemary extracts on the quality of fresh – cut pears. *Food Chemistry* 121, 1003-1009.
- Xing, Y., Xu, Q., Li, X., Che, Z., Yun, J., 2012. Antifungal activities of clove oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* in vitro and in wounded fruit test. *Journal of Food Safety* 32, 84-93.

Table 1. Growth inhibition (radial mycelial growth) of *R. stolonifer* URM 3728, *A. niger* 5842 URM and *A. flavus* URM 4540 in liquid medium throughout seven days of exposure to *O. vulgare* L. and *R. officinalis* L. essential oils alone and in different combinations.

Treatments	Days of exposure (Percent of inhibition)		
	3	5	7
<i>Rhizopus stolonifer</i> URM 3728			
OVEO (MIC: 0.25µL/mL)	97.88%	97.67%	95.64%
ROEO (MIC: 1 µL/mL)	96.89%	97.61%	95.18%
OVEO (1/4 MIC: 0.06 µL/mL) + ROEO (1/4MIC: 0.25 µL/mL)	96.21%	98.57%	95.02%
OVEO (1/2 MIC: 0.12 µL/mL) + ROEO (1/2 MIC: 0.5 µL/mL)	97.80%	98.89%	95.80%
<i>Aspergillus niger</i> URM 5842			
OVEO (MIC: 0.25µL/mL)	98.49%	97.31%	98.52%
ROEO (MIC: 1 µL/mL)	97.41%	96.63%	98.88%
OVEO (1/4 MIC: 0.06 µL/mL) + ROEO (1/4MIC: 0.25 µL/mL)	98.26%	96.34%	99.46%
OVEO (1/2 MIC: 0.12 µL/mL) + ROEO (1/2 MIC: 0.5 µL/mL)	98.35%	96.51%	97.94%
<i>Aspergillus flavus</i> URM 4540			
OVEO (MIC: 0.25µL/mL)	98.60%	98.98%	97.96%
ROEO (MIC: 1 µL/mL)	98.31%	97.71%	97.72%
OVEO (1/4 MIC: 0.06 µL/mL) + ROEO (1/4 MIC: 0.25 µL/mL)	97.09%	97.35%	97.18%
OVEO (1/2 MIC: 0.12 µL/mL) + ROEO (1/2 MIC: 0.5 µL/mL)	96.55%	95.87%	96.45%

OVEO: essential oil from *O. vulgare* L.

ROEO: essential oil from *R. officinalis* L.

Results expressed as percent inhibition of mycelial mass in relation to the control assay (0 µl/mL of essential oil oil)

Table 2. Inhibition of spore germination of *R. stolonifer* URM 3728, *A. niger* URM 5842 and *A. flavus* URM 450 when exposed to *O. vulgare* L. and *R. officinalis* L. essential oils alone and in different combinations.

Treatments	Percent of inhibition		
	<i>R. stolonifer</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>
	URM 3728	URM 5842	URM 4540
OVEO (MIC: 0.25 µL/mL)	95%	100%	100%
ROEO (MIC: 1 µL/mL)	75%	78%	94%
OVEO (1/4 MIC: 0.06 µL/mL) + ROEO (1/4 MIC: 0.25 µL/mL)	93%	93%	96%
OVEO (1/2 MIC: 0.12 µL/mL) + ROEO (1/2 MIC: 0.5 µL/mL)	90%	91%	93%

OVEO: essential oil from *O. vulgare* L.

ROEO: essential oil from *R. officinalis* L.

Results expressed as percent inhibition of spores germination in relation to the control assay (0 µL/mL)

1 **Table 3.** Mean values of physical and physicochemical quality in grapes cultivar Isabella coated with *O. vulgare* L. and *R. officinalis* L. essential oils alone
2 and in different combinations, and stored at room temperature (25°C) for 12 days.

Treatment	Days of storage						
	0	2	4	6	8	10	12
	Firmness (N/mm)						
CTR	48.39 (±1.5)	45.42 (±1.9)	5.70 (±0.7)	5.01 (±0.7)	5.02 (±0.8) ^b	5.21 (±1.1) ^b	4.89 (±0.3) ^b
OVEO 1/4 MIC + ROEO 1/4 MIC	53.67 (±1.3)	48.40 (±1.5)	5.20 (±0.7)	4.11 (±0.5)	4.78 (±0.6) ^b	5.45 (±1.1) ^b	4.87 (±1.5) ^b
OVEO 1/2 MIC + ROEO 1/2 MIC	49.87 (±1.5)	43.64 (±1.8)	5.40 (±0.8)	4.45 (±0.9)	3.92 (±0.7) ^a	3.80 (±1.3) ^a	3.81 (±0.8) ^a
OV MIC	50.76 (±1.0)	49.64 (±1.5)	4.50 (±1.2)	4.71 (±0.4)	4.57 (±0.8) ^b	4.71 (±0.8) ^b	4.69 (±0.7) ^b
RO MIC	49.78 (±1.5)	42.31 (±1.1)	4.92 (±0.9)	4.90 (±0.7)	5.31 (±0.8) ^b	5.74 (±0.8) ^b	4.59 (±1.2) ^b
	Titrable acidity (mmol H ⁺ /100 g of fruit)						
CTR	51.33 (±1.9)	38.60 (±3.8)	34.62 (±1.1)	33.75 (±2.3)	33.75 (±2.2)	33.73 (±1.1)	36.60 (±0.0)
OVEO 1/4 MIC + ROEO 1/4 MIC	48.00 (±1.1)	36.67 (±1.9)	39.65 (±1.1)	39.40 (±1.1)	38.51 (±1.1)	39.05 (±0.0)	32.02 (±0.0)
OVEO 1/2 MIC + ROEO 1/2 MIC	40.90 (±1.1)	34.50 (±1.1)	33.30 (±1.9)	36.25 (±1.9)	36.40 (±2.2)	31.34 (±0.0)	33.81 (±2.1)
OV MIC	46.8 (±0.0)	34.30 (±2.2)	32.90 (±1.9)	33.50 (±3.3)	32.50 (±2.2)	33.70 (±1.1)	32.90 (±1.9)
RO MIC	41.41(±3.1)	38.60 (±1.8)	34.60 (±1.1)	38.45 (±2.6)	33.70 (±2.9)	38.60 (±0.0)	38.75 (±0.0)
	Soluble solids (°Brix)						
CTR	1.40 (±0.1)	1.23 (±0.1)	1.33 (±0.1)	1.80 (±0.1)	1.80 (±0.1)	1.60 (±0.2)	1.73 (±0.1)
OVEO 1/4 MIC + ROEO 1/4 MIC	1.30 (±0.1)	1.50 (±0.0)	1.50 (±0.0)	1.50 (±0.2)	1.70 (±0.1)	1.60 (±0.1)	1.90 (±0.2)
OVEO 1/2 MIC + ROEO 1/2 MIC	1.30 (±0.1)	1.40 (±0.1)	1.40 (±0.1)	1.33 (±0.1)	1.63 (±0.2)	1.70 (±0.1)	1.80 (±0.0)
OV MIC	1.40 (±0.1)	1.40 (±0.1)	1.40 (±0.1)	1.30 (±0.2)	1.40 (±0.1)	1.53 (±0.1)	1.50 (±0.3)
RO MIC	1.40 (±0.0)	1.30 (±0.1)	1.30 (±0.1)	1.40 (±0.3)	1.90 (±0.1)	1.40 (±0.3)	1.33 (±0.3)

3 CTR: control (0 µL/mL); OVEO 1/4 MIC: 0.06 µL/mL + ROEO MIC: 0.25 µL/mL; OVEO 1/2 MIC: 0.125 µL/mL + ROEO 1/2 MIC: 0.5 µL/mL; OV MIC: 0.25 µL/mL;
4 ROEO CIM: 1 µL/mL. ^{a-b} For each trial, different superscript lowercase letters in the same column denote differences ($P < 0.05$) between the mean values according to
5 Tukey's test.

Table 4 . Mean values of physical and physicochemical quality in grapes cultivar Isabella coated with *O. vulgare* L. and *R. officinalis* L. essential oils alone and in different combinations, and stored at cold temperature (12°C) for 24 days.

Treatments	Days of storage								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Firmness (N/mm)									
CTR	48.37 (±1.4)	47.40 (±1.3)	5.01 (±0.8)	4.33(±0.8)	4.28 (±0.5)	4.25 (±0.7)	3.64 (±0.6)	3.83 (±0.4)	2.86 (±0.5) ^b
OVEO 1/4 MIC + ROEO 1/4 MIC	53.49(±1.7)	43.75 (±1.1)	4.11 (±0.5)	4.95 (0.8)	4.89 (±0.1)	4.03 (±0.5)	3.65 (±0.3)	3.50(±0.6)	3.54 (±0.9) ^b
OVEO 1/2 MIC + ROEO 1/2 MIC	54.37(±1.7)	52.90 (±1.0)	4.45 (±0.9)	4.60 (0.9)	4.12 (±0.6)	4.01 (±0.2)	4.10 (±1.0)	3.69(±0.7)	3.55 (±0.5) ^b
OVEO MIC	51.24(±1.0)	48.64 (±1.5)	4.71 (±0.4)	4.34 (0.4)	4.76 (±1.6)	4.03 (±0.5)	3.65 (±0.9)	3.25 (±0.8)	2.02 (±0.5) ^a
ROEO MIC	53.39 (±1.5)	52.44 (±0.4)	4.90 (±0.7)	4.98 (1.0)	4.86(±0.4)	3.80 (±0.2)	3.86 (±0.9)	3.30(±1.0)	3.26 (±1.5) ^b
Titrable acidity (mmol H ⁺ /100 g of fruit)									
CTR	52.33 (±1.9)	46.93 (±1.9)	47.01 (±1.1) ^b	46.80 (±1.1) ^b	47.70 (±1.0) ^b	46.40 (±1.2) ^b	47.50 (±1.2) ^c	36.65(±1.9) ^{a b}	37.95 (±1.9) ^{a b}
OVEO 1/4 MIC + ROEO 1/4 MIC	48.00 (±1.1)	47.10 (±2.2)	42.00 (±1.0) ^a	43.90 (±2.2) ^b	44.30 (±1.8) ^b	42.30 (±1.1) ^b	47.64 (±1.1) ^c	41.20 (±1.9) ^b	41.10 (±1.9) ^b
OVEO 1/2 MIC + ROEO 1/2 MIC	40.90 (±1.1)	40.00 (±1.1)	47.81 (±1.1) ^b	43.14 (±1.9) ^b	46.53 (±2.2) ^b	39.43 (±1.4) ^b	38.74 (±2,2) ^b	31.90(±1.1) ^a	33.30 (±2.3) ^a
OVEO MIC	46.80 (±0.0)	46.90 (±1.9)	47.20 (±2.2) ^b	47.75 (±2.2) ^b	48.20 (±1.2) ^b	46.43 (±16) ^b	47.00 (±0,0) ^c	37.70 (±2.2) ^b	38.30 (±1.1) ^b
ROEO MIC	43.10 (±2.2)	42.70 (±1.1)	41.00 (±1.9) ^a	38.15 (±1.9) ^a	33.65 (±1.1) ^a	34.84 (±1.9) ^a	33.94 (±2,2) ^a	33.05(±2.4) ^{a b}	32.93 (±1.9) ^a
Soluble solids (°Brix)									
CTR	1.40 (±0.1)	1.50 (±0.1)	1.50 (±0.2)	1.30 (±0.1)	1.50 (±0.1)	1.31 (±0.2)	1.43 (±0.1)	1.70 (±0.2)	1.80 (±0.2)
OVEO 1/4 MIC + ROEO 1/4 MIC	1.30 (±0.1)	1.33 (±0.2)	1.43 (±0.1)	1.43 (±0.1)	1.60 (±0.1)	1.42 (±0.1)	1.60 (±0.2)	1.70 (±0.1)	1.53 (±0.1)
OVEO 1/2 MIC + ROEO 1/2 MIC	1.0 (±0.1)	1.40 (±0.1)	1.60 (±0.1)	1.60 (±0.0)	1.50 (±0.1)	1.48 (±0.2)	1.43 (±0.1)	1.80 (±0.1)	1.40 (±0.2)
OVEO MIC	1.40 (±0.1)	1.30 (±0.1)	1.43 (±0.1)	1.50 (±0.1)	1.70 (±0.1)	1.51 (±0.3)	1.50 (±0.1)	1.60 (±0.2)	1.43 (±0.2)
ROEO MIC	1.40 (±0.0)	1.20 (±0.2)	1.40 (±0.2)	1.50 (±0.2)	1.20 (±0.2)	1.53 (±0.1)	1.60 (±0.1)	1.33 (±0.3)	1.70 (±0.1)

CTR: control (0 µL/mL); OVEO 1/4 MIC: 0.06 µL/mL + ROEO MIC: 0.25 µL/mL; OVEO 1/2 MIC: 0.125 µL/mL + ROEO 1/2 MIC: 0.5 µL/mL; OV MIC: 0.25 µL/mL; ROEO CIM: 1 µL/mL. ^{a-c} For each trial, different superscript lowercase letters in the same column denote differences ($P < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test.

Table 5. Mean sensory scores for grapes cultivar Isabella coated with the essential oils from *O. vulgare* L. and *R. officinalis* L. alone and in combinations and stored at cold temperature (12°C).

Attributes	Days of storage	CTR	OVEO 1/4 MIC			
			+ ROEO 1/4 MIC	OVEO 1/2 MIC + ROEO 1/2 MIC	ROEO CIM	OVEO MIC
Appearance	0	7.72 (±0.6)	7.38 (±0.5)	7.06 (±0.7)	7.36 (0.4)	7.36 (±0.8)
	6	7.30 (±0.6) ^b	6.42 (±0.4) ^b	6.60 (±0.6) ^a	6.36 (±0.7) ^a	7.04 (±0.5) ^a
	12	7.70 (±0.3)	6.96 (±0.4)	6.86 (±0.4)	6.82 (±0.6)	7.24 (±0.2)
Color	0	7.70 (±0.5)	7.44 (±0.4)	7.32 (±0.3)	7.24 (±0.8)	7.26 (±0.7)
	6	7.54 (±0.6)	6.52 (±0.7)	6.64 (±0.8)	6.52 (±0.7)	7.04 (±0.6)
	12	8.20 (±0.7)	7.62 (±0.5)	7.36 (±0.6)	7.00 (±0.8)	7.60 (±0.9)
Flavor	0	6.92 (±0.5) ^B	6.68 (±0.3) ^B	5.46 (±0.7) ^A	6.73 (±0.5) ^B	5.72 (±0.6) ^A
	6	6.38 (±0.2) ^{bA}	5.60 (±0.6) ^{aA}	5.36 (±0.8) ^{aA}	5.42 (±0.6) ^{aA}	5.98 (±0.5) ^{aA}
	12	7.76 (±0.3) ^{bB}	7.08 (±0.3) ^{aB}	6.76 (±0.6) ^{aB}	6.82 (±0.5) ^{aB}	6.96 (±0.6) ^{aB}
Taste	0	7.42 (±0.7) ^{cC}	5.98 (±0.5) ^{cC}	3.64 (±0.4) ^{aA}	5.06 (±0.4) ^{bB}	4.68 (±0.3) ^{bA}
	6	6.22 (±0.3) ^{cB}	4.38 (±0.4) ^{bA}	4.30 (±0.5) ^{bB}	3.30 (±0.3) ^{aA}	5.30 (±0.4) ^{bB}
	12	5.56 (±0.2) ^{bA}	5.04 (±0.4) ^{bB}	3.28 (±0.3) ^{aA}	3.36 (±0.6) ^{aA}	3.90 (±0.3) ^{aA}
After taste	0	6.30 (±0.4) ^c	5.50 (±0.5) ^{cB}	3.34 (±0.6)	4.86 (±0.4) ^{bB}	4.16 (±0.8) ^{bA}
	6	5.98 (±0.2) ^c	4.32 (±0.3) ^{aA}	4.04 (±0.7) ^a	3.38 (±0.5) ^{aA}	5.34 (±0.6) ^{bB}
	12	6.14 (±0.6) ^c	5.36 (±0.4) ^{cB}	3.52 (±0.6) ^a	3.14 (±0.6) ^{aA}	3.90 (±0.5) ^{bA}
Firmness	0	7.36 (±0.4)	6.76 (±0.6) ^B	6.14 (±0.5)	6.66 (±0.6) ^B	6.58 (±0.6) ^B
	6	6.54 (±0.5)	5.62 (±0.8) ^A	5.56 (±0.4)	5.32 (±0.4) ^A	6.06 (±0.4) ^{AB}
	12	6.30 (±0.5)	6.54 (±0.4) ^B	5.84 (±0.7)	5.90 (±0.3) ^{AB}	5.32 (±0.5) ^A
Overall evaluation	0	6.64 (±0.8)	6.24 (±0.7) ^B	4.52 (±0.5)	5.74 (±0.6) ^B	5.44 (±0.5) ^B
	6	6.48 (±0.5) ^b	4.88 (±0.6) ^{aA}	4.82 (±0.3) ^a	4.12 (±0.4) ^{aA}	5.68 (±0.6) ^{aB}
	12	6.16 (±0.3) ^b	6.02 (±0.6) ^{bB}	4.28 (±0.3) ^a	4.22 (±0.4) ^{aA}	4.44 (±0.5) ^{aA}

CTR: control (0 µL/mL); OVEO 1/4 MIC: 0.06 µL/mL + ROEO 1/4 MIC: 0.25 µL/mL; OVEO 1/2 MIC: 0.125 µL/mL + ROEO 1/2 MIC: 0.5 µL/mL; OV MIC: 0.25 µL/mL; ROEO CIM: 1 µL/mL. ^{a - c} For each trial, different superscript lowercase letters within a row denote differences ($P < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test; ^{A - C} Different superscript capital letters in the same column denote differences ($P < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test.