



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

ARTHUR VICTOR DA SILVA DIMAS

**QUITOSANA FÚNGICA ASSOCIADA A ÓLEOS VEGETAIS NA
PRESERVAÇÃO DO CAJU: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE ÓLEOS DE
LICURI (*Syagrus coronata*) E TOMILHO (*Thymus vulgaris*)**

Recife-PE

2023

ARTHUR VICTOR DA SILVA DIMAS

**Quitosana fúngica associada a óleos vegetais na preservação do caju:
estudo comparativo entre óleos de licuri (*Syagrus coronata*) e tomilho
(*Thymus vulgaris*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de mestre em Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr.^a Thayza Christina Montenegro Stamford

Recife-PE

2023

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4: 1895

D582q Dimas, Arthur Victor da Silva.
Quitosana fúngica associada a óleos vegetais na preservação do caju: estudo comparativo entre óleos de licuri (*syagrus coronata*) e tomilho (*thymus vulgaris*) / Arthur Victor da Silva Dimas – 2023.
81 p.

Orientadora: Thayza Christina Montenegro Stamford
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2023.
Inclui referências e anexos.

1. Filmes comestíveis. 2. Colheitas agrícolas. 3. Óleos voláteis. 4. Óleo fixo. 5. Antracnose. Stamford, Thayza Christina Montenegro (orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2023 - 256)

ARTHUR VICTOR DA SILVA DIMAS

**QUITOSANA FÚNGICA ASSOCIADA A ÓLEOS VEGETAIS NA PRESERVAÇÃO
DO CAJU: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE ÓLEOS DE LICURI (*Syagrus
coronata*) E TOMILHO (*Thymus vulgaris*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, na área de concentração: **Ciência dos Alimentos**, como requisito para obtenção do título de Mestre em **Nutrição**.

Aprovado em: 24/08/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima (Presidente da banca)
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Prof^a. Dr^a. Luciana de Oliveira Franco (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof. Dr. Antonio Gomes de Castro Neto (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

DEDICATÓRIA

O início desta pesquisa foi marcado pelos avanços galopantes da pandemia de COVID-19. Foi preciso que uma força tarefa mundial de cientistas compreendesse a situação e trabalhassem em prol do desenvolvimento da ajuda para todos. Contudo, uma série de fatores políticos retardou a chegada da ajuda e milhões de vidas foram perdidas. Dedico essa dissertação à memória de todas essas pessoas, em especial à duas Marias, uma que foi uma grande amiga, e outra que era uma grande avó.

AGRADECIMENTOS

Só consegui chegar até aqui graças a mulheres maravilhosas que passaram pela minha caminhada. Meus sinceros agradecimentos às professoras da graduação que sempre acreditaram e incentivaram minha jornada acadêmica, profas. Maria de Fátima (*in memoriam*), Emmanuela Paiva, Ana Carolina e Ana Virgínia, que me acompanharam mais de perto e sempre servirão de modelo profissional para mim; à professora Thayza Stamford pelo suporte, por aceitar a orientação desta pesquisa, por me apontar o caminho das pedras e que me serve de inspiração como pesquisador; à minha amiga Cris Aquino por todos momentos catárticos e conselhos; às minha tias Zita e Val por todo suporte prestado desde sempre; e à minha mãe Simone Rosimar pelo amor incondicional, apoio e atenção sempre presentes.

Também não poderia deixar de agradecer à minha turma de mestrado que junto a mim representaram o que é perseverar na pesquisa científica durante a pandemia, Camila Vilela, Andressa Tavares, Amanda Suellen, Iasmin Azevedo e Regina Escorel, muito obrigado pelo tempo que compartilhamos nessa fase. Desejo tudo de bom na jornada profissional de vocês.

Agradeço imensamente a Ricardo Dimas que, desde a seleção até o fim, esteve ao meu lado torcendo para que eu conquistasse essa etapa.

Agradeço também a todos que me ajudaram nas rotinas de laboratório compartilhando um pouco do que sabiam comigo. Eliana Costa, Roberta Mendes, Gabriel Barboza, Thaysa Ramalho, Maryana Santos, Camila Lopes, Gerlane Lima, Alessandra Araújo, Henrique Guedes, Allef Silva muito obrigado.

Agradeço aos professores Luciana Lima e Marcos Lima e Humberto Xavier que partilharam um pouco dos seus conhecimentos e tempo comigo nesse período.

Agradeço pela participação dos membros da banca examinadora, pelo tempo dedicado e qualidade nas contribuições deixadas na leitura da dissertação.

Agradeço, por fim, à CAPES pela concessão e pagamento da bolsa que me viabilizou financeiramente durante os meses em que estive como pesquisador neste programa de pós-graduação.

“No campo da observação, o acaso favorece apenas mentes bem-preparadas”
(Louis Pasteur, 1854).

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi comparar a capacidade de duas emulsões, quitosana fúngica com óleo essencial de tomilho ou com óleo fixo de licuri, em promover proteção nos pedúnculos de caju contra ação microbiana. Para isso, foram elaboradas duas coberturas comestíveis por método de ultra homogeneização. Em seguida, foram testadas as ações antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Também foram analisadas as alterações morfológicas causadas pelas coberturas no crescimento do *C. gloeosporioides* pela técnica do microcultivo. Logo após, foi verificada a composição fenólica total e o potencial de irritabilidade por HET-CAM. E por fim, as coberturas foram avaliadas quanto ao seu potencial preventivo e curativo contra infecção de *C. gloeosporioides* durante armazenamento a 25°C por 4 dias. As emulsões mostraram-se estáveis durante o tempo de análise. A cobertura de óleo fixo de licuri obteve tamanho de partícula de ~444 nm e a cobertura de óleo essencial de tomilho alcançou ~1 µm. Ambas as coberturas exibiram atividade antimicrobiana contra todos microrganismos testados em diferentes concentrações. A cobertura do óleo essencial de tomilho apresentou ~0,3424 mg GAE/g de compostos fenólicos totais e a cobertura de óleo fixo de licuri ~0,0638 mg GAE/g. Ambas foram consideradas como não irritantes e foram capazes de dobrar o tempo necessário para que o fungo cobrisse toda a superfície dos pedúnculos.

Palavras-chave: filmes comestíveis; colheitas agrícolas; óleos voláteis; óleo fixo; antracnose.

ABSTRACT

This research aimed to compare the capacity of two emulsions, fungal chitosan with thyme essential oil or with fixed licuri oil, to promote protection for cashew's peduncles against pathogenic microorganisms. To achieve this, two edible coatings were formulated using the ultra-mixing method. Antimicrobial tests were conducted against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, and *Colletotrichum gloeosporioides*. Morphological changes caused by the coatings on *C. gloeosporioides* growth were also analyzed. Besides, the total phenolic compounds and irritation potential by Het-Cam analysis were performed. Finally, the cashew's peduncles were separated into two categories: preventive and curative, depending on whether the coating or a spore solution from *C. gloeosporioides* was applied first. After that, the fruits were stored at 25°C for 4 days. The coatings were stable during the analysis course. The fixed licuri oil coating reached particle sizes ~444 nm, while the thyme essential oil reached ~1 µm. Both coatings exhibited antimicrobial activities against all microorganisms tested at different concentrations. Thyme essential oil coating showed ~0,3424 mg GAE/g total phenolic compounds and the fixed licuri oil coating ~0,0638 mg GAE/g. The two coatings were responsible for doubling the time it took for the fungus to cover the peduncles' surface and were considered as non irritating.

Keywords: edible films; agricultural crop; oil volatile; fixed oil; anthracnose.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1	O caju na alimentação e perdas de alimentos.....	13
2.1.1	O caju.....	13
2.1.2	Perdas de alimentos.....	14
2.2	Preservação de alimentos: condição atual e perspectivas futuras.....	16
2.2.1	A cultura do plástico.....	16
2.2.2	Química verde.....	18
2.2.3	Embalagens emergentes.....	19
2.3	Embalagens ativas.....	20
2.3.1	Coberturas comestíveis.....	20
2.3.2	A quitosana.....	22
2.4	Óleos vegetais: essenciais e retificados.....	24
2.4.1	O tomilho.....	25
2.4.2	O licuri.....	26
3	HIPÓTESE.....	29
4	OBJETIVOS.....	30
4.1	Objetivo Geral.....	30
4.2	Objetivos Específicos.....	30
5	METODOLOGIA.....	31
5.1	Materiais.....	31
5.1.1	Frutas.....	31
5.1.2	Reagentes.....	31
5.1.3	Microrganismos.....	32
5.2	Desenvolvimento e caracterização das emulsões base para coberturas comestíveis.....	32
5.3	Determinação de compostos polifenólicos totais.....	34
5.4	Potencial de irritabilidade pelo método Het-Cam.....	34
5.5	Determinação das concentrações inibitórias mínimas das emulsões.....	35
5.6	Potencial de alteração morfológica das emulsões no crescimento fúngico.....	37

5.7	Aplicação das coberturas no caju.....	38
5.8	Análises estatísticas.....	41
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
6.1	Caracterização físico-química das emulsões.....	42
6.2	Determinação da composição de polifenóis.....	44
6.3	Potencial de irritabilidade pelo método Het-Cam.....	45
6.4	Concentrações inibitórias mínimas das emulsões.....	48
6.4.1	Atividade antimicrobiana das emulsões para os patógenos.....	48
6.4.2	Crescimento microbiano de <i>C. gloeosporioides</i> em presença das emulsões.....	52
6.4.3	Atividade antimicrobiana para <i>C. gloeosporioides</i>	54
6.5	Potencial das emulsões em causar alteração morfológica no crescimento do <i>C. gloeosporioides</i>	55
6.6	Aplicação das coberturas no caju.....	57
6.6.1	Capacidade das coberturas de manter a massa dos caju.....	57
6.6.2	Ação das coberturas contra <i>C. gloeosporioides</i>	60
7	CONCLUSÕES.....	67
	REFERÊNCIAS.....	68
	ANEXO A - 12 princípios da Química Verde por Anastas e Warner (1998).....	79
	ANEXO B - Grupo de Trabalho Agenda 2030.....	80
	ANEXO C - Análise cromatográfica do óleo essencial de tomilho performada pela UFMG a pedido da AMANTIKIR.....	81

1 INTRODUÇÃO

O cajueiro (*Anacardium occidentale*) é uma planta autóctone do Brasil com participação na alimentação dos povos nativos antes da colonização portuguesa e que conquistou o paladar dos povos escravizados e dos colonizadores. Durante esse período histórico a planta acessou outros continentes e hoje é explorada por diversas agriculturas no mundo. Seu fruto e seu pseudofruto são comercializados e têm diversos usos. Contudo, seu pseudofruto possui uma rápida deterioração e requer proteção para que seu tempo de prateleira seja estendido (LIMA *et al.*, 2022).

Quando não há proteção adequada, ocorrem perdas nas etapas de produção e a eficiência de embalagens, incluindo coberturas comestíveis, pode ser reduzida, aumentando o tempo útil de armazenamento e transporte. Um percentual aproximado de 14% dos alimentos produzidos mundialmente é desperdiçado, o que seria suficiente para alimentar mais de 40% das pessoas sem acesso à alimentação saudável. A natureza das hortifrutícolas faz delas a categoria mais afetada por perdas, requerendo então maior preocupação na proteção logística até o consumidor final (BALCI; TUNA, 2021).

Dessa maneira, os plásticos são amplamente utilizados em todo o mundo devido às suas características de facilidade de moldagem, resistência e versatilidade em aplicações domésticas e industriais (LEE *et al.* 2023). No entanto, o aumento do consumo de produtos descartáveis resultou em um acúmulo de plástico na natureza, uma vez que o tempo de decomposição pode levar vários séculos (SANTOS; SILVA; E RIBEIRO, 2022).

Além disso, a dependência de plásticos é evidente em uma ampla gama de produtos, desde móveis até embalagens de alimentos. O aumento na produção *per capita* de lixo no Brasil na última década destaca a necessidade de encontrar alternativas mais sustentáveis. Nesse sentido, a indústria de alimentos está buscando materiais alternativos que satisfaçam as necessidades de proteção dos alimentos e requisitos ambientais (QASIN *et al.*, 2021).

Em contraste, tem-se o surgimento da química verde com o objetivo de contribuir com soluções inovadoras para processos industriais, visando a eficiência, prevenção de perigos, prevenção da poluição e substituição de compostos de alta

toxicidade (WHITEKER, 2019). Nesse sentido, o ramo se torna um aliado das indústrias na redefinição das embalagens de alimentos. Polímeros naturais estão sendo considerados como alternativas aos materiais tradicionais, com foco em bioplásticos extraídos de rejeitos vegetais; embalagens de hidrogéis constituídas de polímeros biodegradáveis naturais também são uma opção, mas requerem formulação individual para cada tipo de alimento (LEYVA-JÍMENEZ *et al.*, 2023).

Um exemplo disso são os revestimentos comestíveis, uma opção de embalagem primária produzida com polímeros naturais que atuam como barreira de proteção contra a deterioração pós-colheita. Eles se dividem em filmes e coberturas e podem ser compostos de proteínas, lipídios e carboidratos. Testes foram realizados com diferentes polímeros para avaliar a eficácia das coberturas comestíveis na conservação de frutas e foi observado que a hidroxipropilmetilcelulose e a quitosana foram os mais eficazes na conservação sustentável de frutas (RUX *et al.*, 2023).

Ademais, os óleos vegetais possuem propriedades antimicrobianas devido a compostos como ácidos graxos, tocoferóis e polifenóis, tornando-os uma opção para substituir conservantes alimentares sintéticos. Da mesma forma, óleos essenciais extraídos de tecidos vegetais, que contêm altas concentrações de compostos orgânicos voláteis e aromáticos, têm sido estudados por seus efeitos terapêuticos, como a redução do estresse, melhora da digestão e alívio da dor. Além disso, a eficácia antimicrobiana de óleos essenciais como tomilho, canela, alecrim e orégano contra diversos microrganismos patogênicos foi confirmada em estudos recentes (OUN *et al.*, 2022).

Por isso, a presente pesquisa visou convergir os conceitos da química verde para a produção de cobertura comestível para aplicação no pedúnculo do caju, comparando a associação da quitosana fúngica com o óleo fixo de Licuri e o óleo essencial de Tomilho, a fim de propor uma substituição do uso de embalagens plásticas e conservantes sintéticos na preservação deste produto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O caju na alimentação e perdas de alimentos

2.1.1 O caju

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta nativa do Brasil, cultivada comercialmente para a produção de seu fruto, a castanha, bem como do pseudofruto, tecido vegetal polposo adjacente à castanha. É considerado uma mercadoria importante em vários países tropicais, incluindo a Nigéria, Índia, Vietnã e Brasil. No entanto, a produtividade desse cultivo pode ser afetada por vários fatores, como pragas, fertilidade do solo e, mais recentemente, pelas mudanças climáticas (LIMA *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2019; REINA *et al.*, 2022).

Os cajueiros foram difundidos ao redor do globo conforme avançava a colonização portuguesa. Dessa forma, diversas espécies vegetais foram trazidas para o Brasil, como o coco de Cabo Verde e a manga oriunda de Goa, mas outras tantas foram levadas do território brasileiro para as outras terras exploradas pelos lusitanos. A entrada na Ásia ocorreu pela Índia, onde o cajueiro se adaptou bem ao clima e posteriormente foi incorporado na alimentação do local. Já a aceitação no continente africano, na região de Moçambique, o caju tornou-se mais íntimo do povo do que a já conhecida manga de origem indiana, haja vista que seu cultivo era mais simples e a colheita mais fácil pois a altura média da planta era menor do que a da mangueira (CASCUDO, 2016).

Ainda durante o período de colonização, o caju desempenhou um papel importante na alimentação dos povos escravizados, pois no pseudofruto eles encontraram a saída para o escorbuto provocado pela avitaminose frequente nos meses de viagem nos navios negreiros. Da mesma forma como as tropas holandesas também o consumiam com o mesmo intuito. Antes mesmo do período de colonização há relatos de povos indígenas que cultivavam cajueiros e consideravam a espécie como fundamental para sua subsistência (CASCUDO, 2014).

Hoje em dia no Brasil sua produção é mais difundida na região Nordeste, onde pequenos produtores, muitas vezes oriundos da agricultura familiar, se organizam de forma colaborativa para o escoamento da produção sendo os estados

do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte são os maiores produtores nacionais (EMBRAPA, 2023).

Enquanto que a castanha é aproveitada para consumo após torra, produção de biodiesel e produção de bebidas vegetais análogas ao leite, o pseudofruto é comercializado para consumo *in natura*, produção de geleia, passas de caju, sucos, refrigerantes, bebidas alcoólicas e recentemente suas fibras têm sido utilizadas na produção de produtos análogos à carne (VELOSO et al., 2018; FAUSTINO et al., 2021; SUCUPIRA et al., 2020).

Em relação aos parâmetros de composição, cada 100g do pedúnculo de caju provém 10g de carboidratos, 0,77 g de proteínas, 0,49 g de lipídios, 257 mg de vitamina C, 17,4 mg de vitamina A (RE), além de oferecer cálcio 1,39 mg, ferro 0,15 mg, sódio 2,92 mg, magnésio 9,94 mg, potássio 121 mg, fósforo 15,4 mg, zinco 0,09 mg, cobre 0,07 mg e betacaroteno total 90 mcg (TBCA, 2023).

Atualmente o maior fator limitante para o aumento da exploração comercial do pedúnculo do caju *in natura* está na alta perecibilidade. Estima-se que em um tempo médio de 48 horas o pseudofruto já esteja inviável comercialmente devido a sua alta fragilidade (SENA et al, 2019).

2.1.2 Perdas de alimentos

As perdas de alimentos são um problema crucial vivenciado em escala global. Estima-se que cerca de 14% do produzido mundialmente não é aproveitado na alimentação se tornando rejeito. Esse montante seria suficiente para alimentar anualmente mais de 40% das pessoas que sobrevivem em insegurança alimentar (FAO, 2019).

Esse cenário é ainda mais preocupante quando se estima os desperdícios de uso de solo, fertilizantes e água para produzir os alimentos perdidos. Os dados apontam que, ao contrário do que o setor agrícola tem feito, a urgência não está em aumentar a produção para alimentar mais pessoas, mas sim em melhorar a eficiência das etapas de produção e distribuição (ABBADE, 2020).

As perdas ocorrem em todas as etapas de produção, desde o manejo agrícola, colheita, operações unitárias de processamento, logística de transporte, comércio e com o cliente final. Tais perdas são um problema multifatorial que

demanda diferentes soluções para cada fator (MATZEMBACHER; VIEIRA; BARCELLOS, 2021).

As hortifrutícolas são a categoria mais afetada por perdas e torna-se um grande desafio protegê-las durante a cadeia produtiva devido aos seus fatores intrínsecos. Contudo, em especial, a manipulação durante o processamento é grande responsável pelas perdas nessa categoria (FACCHINI *et al.*, 2023; BALCI; TUNA, 2021).

A estimativa de perda dessa categoria gira em torno dos 55% e a ação fúngica é considerada a maior deteriorante das etapas de pré e pós-colheita. A propensão em especial do ataque fúngico em frutas ocorre devido a elas representarem um ambiente favorável para seu crescimento, contendo em geral baixo pH, alta atividade de água e biodisponibilidade dos compostos necessários para o desenvolvimento. Somado a isto o fato de que muitas frutas sofrem danos aos seus tecidos durante a manipulação pós-colheita e os fungos encontram nas frutas o ambiente propício para proliferação (RANJBAR *et al.*, 2022; SILUÉ *et al.*, 2022).

A eficiência de embalagens, em especial as coberturas comestíveis, pode auxiliar na redução da perda de alimentos uma vez que promove o aumento do tempo útil em que o alimento pode ser armazenado e transportado (FACCHINI *et al.*, 2023).

No caso do caju, a maior suscetibilidade a perdas está no desenvolvimento da antracnose, problema derivado do ação fitopatogênica das espécies de *Colletotrichum* e que são responsável por perdas que podem ultrapassar os 40% no campo. Estes mesmos microrganismos são os principais biodeteriorantes quando contaminam os cajus nas etapas de pós-colheita (VELOSO *et al.* 2018).

A propogação desse fungo pode ocorrer por meio do vento, da chuva ou a partir de animais e as temperaturas ambiente e alta umidade do ar, acima de 80%, encontrada principalmente na região nordeste favorecem seu desenvolvimento. Todos os tecidos vegetais do cajueiro podem ser atacados, porém nos frutos e pedúnculo ficam mais evidentes. Lesões (figura 1) como manchas escuras e polpa exposta dado a superfície dilacerada são as sintomatologias relacionadas com a antracnose (SOUZA; VIEIRA; NEVES, 2019).

Com isso, tradicionalmente o combate a essa doença é feito com uso de agrotóxicos como oxicleto de cobre, hidróxido de cobre e ditiocarbamato, contudo o uso de óleos vegetais com ação antimicrobiana tem se tornado uma alternativa para o plantio orgânico e sustentável frente ao uso dos pesticidas agrícolas utilizados (VELOSO et al. 2022).

Figura 1. Lesões em castanha (A) e caju (B) causadas pela antracnose.

A



B



Fonte: Marlon Vagner Valentin Martins (EMBRAPA).

2.2 Preservação de alimentos: condição atual e perspectivas futuras

2.2.1 A cultura do plástico

Os plásticos são polímeros sintéticos explorados em larga escala em todo o globo, devido a suas características como facilidade de moldagem, extrusão e resistência após confecção. Eles revolucionaram a ciência de materiais e a humanidade com aplicações desde o ambiente doméstico até o industrial. Suas aplicações são recentes na história com seu surgimento tendo ocorrido no início do século XX (LEE *et al.*, 2023).

Contudo, a mudança no paradigma de consumo, iniciada no século passado e que se estende até a atualidade, pautada no imediatismo e no consumo de produtos de uso único, colocou o plástico na figura de vilão, haja vista que se

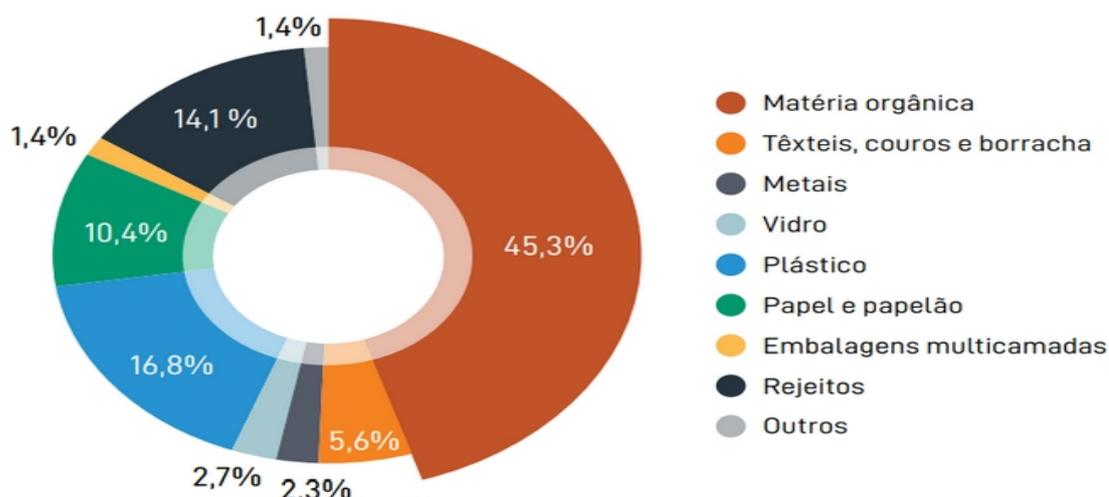
acumula na natureza após descarte, pois seu tempo estimado de decomposição pode passar de quatro séculos (SANTOS; SILVA; RIBEIRO, 2022).

Exemplos da atual dependência do uso de plásticos vão desde escovas de dentes, móveis, peças para automóveis, eletrodomésticos, redes de pescas, encanamentos, vestuário, materiais agrícolas, materiais médicos, materiais aeroespaciais, materiais para construção civil e embalagens de alimentos (ARMENISE *et al.*, 2021; TAN *et al.*, 2023). A criatividade humana encontrou nos plásticos muitas soluções, mas deixou de lado por muito tempo a preocupação com o impacto que esses materiais podem gerar nos ecossistemas.

A Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais (ABRELPE), em seu mais recente relatório (2020) sobre a produção brasileira de resíduos sólidos, aponta para o crescimento da produção *per capita* de lixo na década que compreende os anos de 2010-2019. O estado de Pernambuco, neste recorte, participou com a produção de 3.285.730 toneladas em 2019, um aumento de quase 17% em relação ao início do decênio. Esses quantitativos podem ser ainda maiores, haja vista que o estado não possui cobertura de coleta em todo seu território. A associação concluiu ainda que o país produziu 13,35 milhões de toneladas de plástico apenas em 2020 e que esse é o resíduo seco mais abundante, logo após o lixo orgânico, conforme figura 2.

A onipresença dos plásticos no cotidiano é indiscutível, embora não insubstituível. Dessa maneira, uma vez identificada a problemática enfrentada pelo uso de plásticos tem-se buscado materiais alternativos que possuam propriedades semelhantes, mas que gerem uma menor seqüela ao meio ambiente. Neste cenário, a indústria de alimentos busca oportunizar o uso de embalagens que possuam novos materiais que satisfaçam a necessidade de proteção do alimento ao passo que atenda aos requisitos ambientais (QASIN *et al.*, 2021).

Figura 2. Gravimetria dos resíduos sólidos do Brasil.



Fonte: ABRELPE, 2020.

2.2.2 Química verde

A química verde é um ramo da química, pautado em 12 princípios (Anexo A), cujo objetivo é estimular o uso consciente dos compostos químicos no desenvolvimento de produtos e processos industriais (YILAN; CORDELLA; MORONE, 2022).

O movimento surgiu na década de 1990, com o escopo de alertar para os danos que os processos produtivos tradicionais da época causavam. Desde então, essa especialidade tem contribuído para o conhecimento científico com soluções inovadoras para processos industriais visando a eficiência, prevenção de perigos, prevenção da poluição e substituição de compostos de alta toxicidade (WHITEKER, 2019).

O conceito de sustentabilidade preconiza o uso dos recursos ambientais em uma taxa na qual seja possível que o ecossistema fornecedor se autorregule para o estado anterior ao da exploração. À vista disso, o desenvolvimento sustentável equaliza a garantia de que a geração atual consiga satisfazer suas demandas sem comprometer a chance das próximas gerações de explorar os mesmos recursos (ROSA *et al.*, 2022; ONU, 2015a).

O processo proposto nesta pesquisa buscou alinhamento com as prerrogativas da química verde, uma vez que se preocupa com o todo o ciclo do desenvolvimento, desde a escolha das matérias-primas, sua produção e descarte. Ademais, projeta uma solução para a problemática do consumo de plásticos, seguro para ingestão, usando polímeros renováveis e biodegradáveis. Está ainda aderido diretamente a dois objetivos do desenvolvimento sustentável apresentadas pela Organização das Nações Unidas (anexo B), a saber: (i) Erradicação da Fome, uma vez que o foco é aumentar o tempo de prateleira de alimentos e com isso reduzir o desperdício; (ii) Consumo Responsável, haja vista que a elaboração de uma alternativa ao plástico foi apresentada; transversalmente atende ainda os objetivos de: Combate às mudanças climáticas e Vida Debaixo da Água, em razão da proposta de atenuar a dependência do plástico, que de outra forma poderia colaborar com a poluição dos ecossistemas (ONU, 2015b).

2.2.3 Embalagens emergentes

A grande missão do setor de alimentos é entregar ao consumidor final o produto íntegro, saudável e que possua seus parâmetros de identidade e qualidade da forma esperada e idealizada pelos produtores. Dessa forma, as embalagens de alimentos são o invólucro no qual os produtos são acondicionados durante essa logística, protegendo-os do ambiente externo, evitando trocas de massa e conferindo proteção contra a luz (LI *et al.*, 2022; AAYUSH *et al.*, 2022).

Se outrora a escolha tradicional de materiais comuns para embalagens de alimentos figurava dentre vidro, madeira, papel, papelão, plástico, aço, ou na combinação destes como os *pouches* flexíveis e o papel cartonado, atualmente busca-se soluções para essas escolhas nos polímeros naturais (BRASIL, 2001; BANDARA, INDUNIL, 2022).

A busca de materiais que possam substituir os polímeros sintéticos para produção de plásticos encontra soluções no uso de rejeitos vegetais, segundo Ali e colaboradores (2022). As propostas compiladas pelos pesquisadores visam extrair biomoléculas para a formação de polímeros biodegradáveis, os chamados bioplásticos.

Exemplos de embalagens alternativas para alimentos foram sugeridos por Leyva-Jímenez e colaboradores (2023) no uso de hidrogéis constituídos de polímeros biodegradáveis naturais, uma vez que essa categoria possui maior biocompatibilidade e aceitação dos consumidores. Tais compostos são extraídos de fontes vegetais ou animais para subsequente aplicação na superfície do alimento. Contudo, enquanto os materiais tradicionais oferecem proteção para um grande espectro de alimentos, a manufatura de embalagens de polímeros naturais precisa que sua formulação seja desenvolvida individualmente para cada produto.

2.3 Embalagens ativas

2.3.1 Coberturas comestíveis

As trocas de gases, vapor de água, danos mecânicos e ataque microbiano são os principais agentes promotores naturais da deterioração pós-colheita. Dessa forma, utilizam-se embalagens para estender a vida de prateleira de hortaliças e viabilizar a logística de transporte do campo até os consumidores finais. Os revestimentos comestíveis são embalagens primárias, ou seja entram em contato direto com o alimento, que podem ser aplicados diretamente sobre a superfície externa de alimentos de origem animal ou vegetal. Esses revestimentos são produzidos de polímeros naturais e atuam como barreira de proteção contra a senescência dos produtos (MURMU; MISHRA, 2022; SHEN *et al.*, 2023).

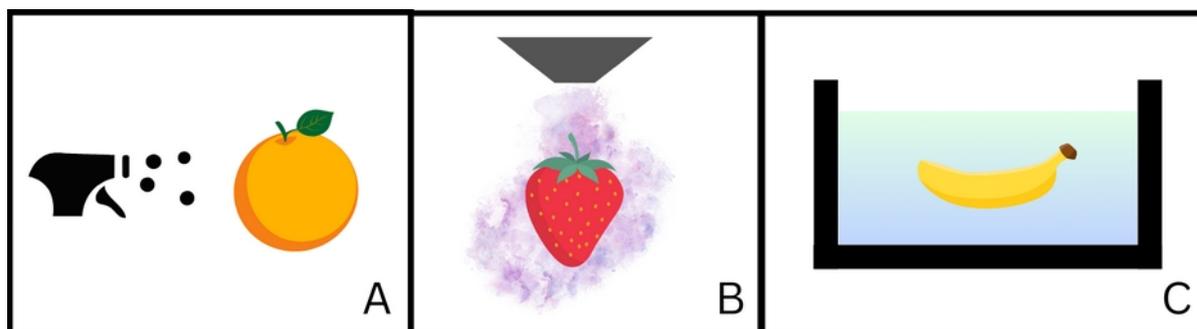
Os revestimentos comestíveis se dividem em dois grupos: os filmes e as coberturas. Ainda que possam ter a mesma formulação, eles possuem métodos de aplicações diferentes. A aplicação da cobertura (figura 3) requer que a formulação seja realizada em estado líquido, tendo como opções submergir, pulverizar ou submeter a um leito fluidizado. A formulação do filme comestível é previamente desidratada antes da aplicação nas superfícies do alimento. Sua eficácia ocorre devido à sua ação como uma camada extra de proteção isolante entre o produto e a atmosfera (ALVES *et al.*, 2022).

Quanto à composição, os revestimentos podem ser subdivididos com base em proteínas, como o colágeno, proteína de soja, proteína do soro do leite e glúten; lipídios, como as ceras de abelha, candelila, carnaúba e parafina; e carboidratos,

como as gomas alfarroba, carragena, guar, tragacanto, xantana, arábica, celulose, pectina, amido de milho e quitosana (FIRDUOS *et al.*, 2023).

A definição da formulação da cobertura deve complementar as características do alimento que ela irá revestir. Dessa forma, alimentos que possuem tendência a perder umidade podem receber revestimentos com base em lipídios, pois devido a sua natureza hidrofóbica conseguem reter a umidade interna (HASSAN *et al.*, 2018).

Figura 3. Diferentes métodos de aplicação das coberturas comestíveis.



A – Aplicação por pulverização. B – Leito fluidizado. C – Imersão.

Fonte: Autoria própria.

Rux e colaboradores (2023) testaram esse raciocínio aplicando em pepinos o *Liquid Seal*[®], um revestimento com base em ésteres de glicerol e ácidos graxos de cadeia entre 16-18 carbonos. Os dados apontam para o aumento da vida de prateleira do fruto, redução da taxa de respiração, emissão de gases e vapor de água, redução da rigidez tecidual. Ademais a equipe constatou, através de pesquisa aplicada em 148 pessoas, que os consumidores não apenas se preocupam com o lixo produzido a partir do consumo, mas também que os revestimentos comestíveis aplicados em frutas são uma boa alternativa para as embalagens plásticas.

Seguindo essas premissas, Jurić e colaboradores (2023) testaram a eficácia da aplicação de uma cobertura comestível em tangerinas. Após testarem diferentes polímeros, concluíram que a hidroxipropilmetilcelulose e a quitosana foram os que obtiveram melhor performance durante o estoque em temperatura ambiente, por 10 dias, e em estoque refrigerado, por 28 dias. Foi possível observar a conservação sustentável da fruta com materiais baratos e alinhados com as novas demandas ambientais.

Frutas minimamente processadas apresentam praticidade para os consumidores, porém devido às etapas de processamento como o descascamento, tornam-se mais vulneráveis à deterioração em razão da exposição ao ar. Visando solucionar esse problema, Du e colaboradores (2023) desenvolveram uma cobertura comestível com base em pectina adicionada de quercetina para aplicação sobre fatias de maçãs. Além da manutenção da firmeza, umidade, teor de vitaminas e cor, a equipe também ratificou a proteção antimicrobiana conferida pela cobertura contra *Staphylococcus aureus* e a *Listeria monocytogenes* por um período de até 10 dias.

2.3.2 A quitosana

Do ponto de vista químico a quitosana (figura 4) é um polímero natural derivado da desacetilação da quitina, são resíduos de glucosamina unidos a partir das ligações glicosídicas β -(1→4) formando uma poliamina linear. Diante do panorama ambiental esse polímero é promissor devido sua biodegradabilidade e capacidade de reuso (YADAV *et al.* 2019).

A obtenção clássica da quitosana ocorre por meio da transformação da quitina presente nos exoesqueletos de crustáceos remanescentes das indústrias alimentícias. Esse processo inicia com a desproteinização e desmineralização das cascas dos animais, seguido da desacetilação, cujos grupamentos acetil são removidos das glucosaminas, formando então um novo conjugado, a quitosana. Após essa etapa a substância pode passar por purificação e secagem para então ser comercializada (SARAVANAN *et al.*, 2023; CHAKRAVARTY e EDWARDS, 2022).

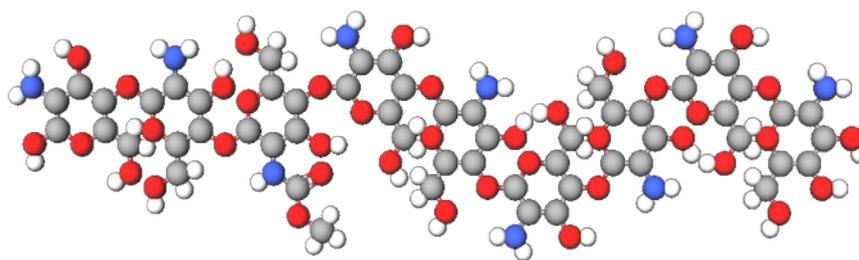
Outra forma de ser obtida é a partir de fontes fúngicas, através da conversão da quitina em quitosana por fungos da classe *Zygomycetes*. Essa rota de obtenção possui vantagens quando comparada à tradicional, pois diferente desta a produção de quitosana de origem fúngica não requer uso de solventes fortes, emprego de altas temperaturas e não se baseia na disponibilidade de subprodutos animais podendo ser escalonada para níveis industriais em biorreatores (NASCIMENTO *et al.*, 2020; BERGER *et al.*, 2018).

A quitosana de origem fúngica possui menor peso molecular quando comparada à quitosana de origem animal, o que pode afetar suas propriedades

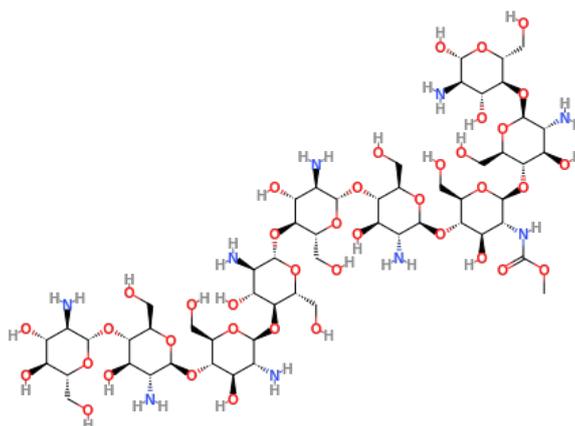
físicas e biológicas. Além disso, a quitosana de origem fúngica é mais pura, não possuindo resquícios de proteína animal que são considerados alergênicos e pode então ser uma alternativa para pessoas com alergia a crustáceos ou vegetarianas e veganas (MELO *et al.*, 2018).

Figura 4. Modelo em 3D (A) e fórmula estrutural (B) da molécula de quitosana.

A



B



Fonte: molview.org/?cid=71853

Essa substância possui grande versatilidade e ampla aplicabilidade em diversas indústrias devido a suas características de biocompatibilidade e baixa toxicidade. Como por exemplo, possui capacidade de adsorver partículas e proteínas a torna útil em etapas de clarificação de bebidas alcoólicas; possui vasta aplicação no desenvolvimento de embalagens ativas para alimentos; tem aplicação na indústria agrícola no recobrimento antimicrobiano de sementes; além de ser usada na área médica na engenharia de tecidos e na recuperação de pele lesionada

(ADAIR *et al.*, 2023; MOUZAHIM *et al.*, 2023; NARAYANA *et al.*, 2023; YADAV *et al.*, 2021).

O caráter multifuncional da quitosana encontra na aplicação nas coberturas comestíveis em alimentos, pois promove proteção, devido a sua capacidade de formação de filme, criando uma barreira isolante na superfície aplicada. Ela demonstrou possuir atividade antimicrobiana e é considerada como um agente promissor no aumento do tempo de prateleira dos alimentos, haja vista que reduz o processo de senescência, promove a manutenção do peso e da humidade. Além disso, ela não causa alterações organolépticas nos produtos e tem boa aceitação sensorial (LIMA *et al.* 2023; NASCIMENTO *et al.*, 2020; MELO *et al.*, 2018). Com o exposto, nesta pesquisa foi utilizada a quitosana de origem fúngica associada a óleos de origem vegetal com o intuito de propiciar sinestesia no desenvolvimento de coberturas comestíveis.

2.4 Óleos vegetais: essenciais e retificados

A definição do Ministério da Saúde para os óleos essenciais é descrita pela ANVISA (2022) da seguinte forma:

“aromatizante natural volátil de origem vegetal obtido por processo de destilação por arraste com vapor de água, de destilação a pressão reduzida ou por outro processo físico adequado, podendo se apresentar isolado ou misturado com outro óleo essencial, compreendendo o retificado, o desterpeneado e o concentrado;” (artigo 2º, item XX)

Já a definição para o óleo retificado de origem vegetal é compreendida como “óleo essencial submetido a processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes;” Dessa forma a maior divergência entre os produtos está no perfil não volátil dos óleos retificados frente ao perfil aromático intenso dos óleos essenciais (MASIERO *et al.*, 2021). Popularmente no Brasil o termo “óleo fixo” é usado em referência ao óleo retificado, essa expressão pode ter surgido dado que em inglês o termo é “*fixed oil*” que pode ser traduzido tanto para “óleo fixo” como para “óleo retificado”.

Óleos vegetais de diversas espécies demonstraram ação antimicrobiana contra vasto espectro de microrganismos patogênicos, o que pode os tornar viáveis

em substituição de conservantes alimentares sintéticos. Tal atividade deriva da presença de compostos como ácidos graxos, tocoferóis e polifenóis (SARKAR *et al.*, 2022; COIMBRA *et al.*, 2022; KHALDI, NAOUARI e JEMAA, 2021; BAŞYIĞIT *et al.*, 2020; PARICHANON, *et al.*, 2022).

Óleos essenciais são produtos desenvolvidos a partir de extratos de tecidos vegetais, possuem grande concentração de compostos orgânicos voláteis e aromáticos e são formados por um conjunto de centenas de moléculas que são responsáveis pelo aroma e sabor característico de cada planta. Geralmente são obtidos a partir da destilação a vapor que separa esses voláteis com posterior concentração na forma líquida. Esses produtos são consumidos globalmente e recentemente diversas alegações são feitas em relação a efeitos terapêuticos como a redução do estresse, ansiedade, melhora da digestão, redução da inflamação e alívio da dor (TAO; SEDMAN; ISMAIL, 2021; PATEIRO, *et al.*, 2021;).

O uso destes óleos como agentes antimicrobianos naturais é promissor tendo vários estudos confirmado essa eficácia. Por exemplo, o óleo essencial de tomilho teve sua ação contra *L. monocytogenes* confirmada por Coimbra e colaboradores (2022); a atividade bactericida contra *Pseudomonas parolactis* e contra *Lactobacillus sakei* do óleo essencial de canela observada por Fan e colaboradores (2023); atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* do óleo de alecrim comprovada por Gahvan (2022); óleo essencial de orégano com atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *Escherichia coli*. demonstrada por Oun e colaboradores (2022).

2.4.1 O tomilho

O tomilho, *Thymus vulgaris* L., (Figura 5) é uma erva aromática de folhas pequenas com origem na região do mediterrâneo onde seu uso é amplamente empregado na culinária dos países banhados pelo Mar Mediterrâneo e ao seu chá são atribuídas propriedades terapêuticas. Seus sabores são descritos como uma fusão entre o orégano, a hortelã e o limão (MCGEE, 2014).

A metanálise de Silva e colaboradores (2021) compilou informações científicas a respeito do consumo do tomilho em várias formas de apresentações como fresco, seco e seu óleo essencial. Os pesquisadores descreveram diversos

estudos que indicam ações antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatórias, anticâncer, hepatoprotetoras e antioxidantes, ainda que mais estudos clínicos de grande porte sejam necessários. A equipe concluiu, porém, que a falta de padronização nos produtos à base de tomilho pode implicar na modulação desses efeitos e inclusive apresentar riscos de consumo e toxicidade devido à presença de metais pesados ou substâncias em concentrações tóxicas.

Figura 5. Tomilho



Fonte: Portal Pense Organicamente

De maneira análoga, a pesquisa de Salehi e colaboradores (2019) reforça as ações bioativas do consumo tomilho e indica que o seu uso na forma de óleo essencial possui grande potencial de exploração pela indústria de alimentos, principalmente no desenvolvimento de embalagens bioativas, dado ao seu potencial de promover a preservação de alimentos. Contudo, ressaltam que, ainda que o tomilho seja uma das plantas medicinais mais pesquisadas do mundo, uma futura exploração dessa planta na produção de fitofármacos requer que maiores pesquisas clínicas sejam conduzidas, elucidando os mecanismos de ação e a dosagem para cada patologia.

2.4.2 O licuri

O licurizeiro (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.) é uma palmeira nativa do Brasil que possui alta resistência a longos períodos de estiagem (Figura 6). Sua

prevalência ocorre na caatinga nordestina onde, dada a cultura sertaneja, seu fruto, o licuri, serve como fonte de alimento para humanos e para os animais de criação da região do semiárido (LISBOA *et al.*, 2020).

Essa espécie está diretamente relacionada com a subsistência da comunidade sertaneja, haja vista que há ainda uso das suas folhas na produção de artesanatos, objetos como vassouras, chapéus e ceras. O resíduo resultante da moagem do tronco e fruto serve como ração animal e na construção civil. A árvore é ainda transplantada para outras regiões para ter uso em ornamentação em épocas de festas típicas. A importância é tal que ela é conhecida nessas regiões como “salvadora da vida” (EMBRAPA, 2007).

Figura 6. Cacho de licuri



Fonte: Marcos Antônio Drumond

A polpa do licuri pode ser consumida *in natura*, cozida ou beneficiada em bebidas alcoólicas, doces, cocada e farinha. O fruto, quando seco, apresenta uma amêndoa cujo teor de lipídeos pode ultrapassar 49% e o teor de proteína pode atingir mais de 11% de sua composição (SOUZA, 2018).

O extrato oleoso do licuri é primariamente composto por ácidos graxos saturados de cadeia média como o ácido láurico, ácido mirístico e oleico. Esse óleo pode ser utilizado na culinária, na produção de cosméticos, na produção de biocombustível e pela indústria farmacêutica devido a suas atuações como atividade

anti estafilocócica, larvicida e ovicida contra o mosquito *Aedes aegypti*, cicatrizante e anti-inflamatória (SOUZA *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2017; SOUZA, 2018).

3 HIPÓTESE

Coberturas comestíveis à base de quitosana fúngica e óleo fixo de licuri ou óleo essencial de tomilho são efetivas na proteção biológica do pedúnculo de caju e na manutenção de sua qualidade durante o armazenamento a 25°C.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliação do potencial antimicrobiano e de preservação do pedúnculo de caju comparando a combinação do óleo fixo de licuri ou do óleo essencial de tomilho com quitonasa fúngica.

4.2 Objetivos Específicos

- Elaborar e caracterizar as emulsões de quitosana com o óleo fixo de licuri ou óleo essencial de tomilho.
- Avaliar a atividade antimicrobiana e o potencial de irritabilidade das emulsões.
- Observar as alterações morfológicas causadas pelas emulsões em *C. gloeosporioides*.
- Avaliar os efeitos de coberturas preparadas com as emulsões obtidas na inibição de infecção por *C. gloeosporioides* no pedúnculo de caju durante armazenamento em temperatura ambiente (25°C).

5 METODOLOGIA

As etapas experimentais foram realizadas principalmente no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LaMAp) e no Instituto de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), ambos na Universidade Federal de Pernambuco. As análises de caracterização das emulsões foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica na UFPB. As análises de alterações morfológicas do crescimento fúngico foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Ambiental na UFRPE.

5.1 Materiais

5.1.1 Frutas

Os cajus vermelhos, em estágio de maturação comercial, foram adquiridos na Família Horti - Horti Fruti Delivery, que fica localizada no Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco (CEASA-PE). O fornecedor dos cajus fica localizado na cidade de Petrolina-PE. Foram selecionadas apenas unidades sem danos físicos e microbianos visíveis e que contivessem a castanha anexa de forma firme. Eles foram transportados em caixa térmica até o LaMAp na UFPE, local onde as análises foram realizadas.

5.1.2 Reagentes

A quitosana foi cedida pelo LaMAp e produzida por *Aspergillus niger*, não produtor de micotoxina, por extração álcali-ácido e possuindo baixo peso molecular ($5,08 \times 10^3$ g/mol ($\pm 0,4$)) e grau de desacetilação de 85% (± 2) (STAMFORD *et al.*, 2007).

Os demais produtos usados foram glicerol; Tween 80; óleo essencial de tomilho (AMANTIKIR), produzido por extração de arraste a vapor das partes aéreas da planta; e óleo fixo de licuri, cedido pelo Laboratório de Produtos Naturais (UFPE).

A pedido da AMANTIKIR ORIGEM NATURAL EIRELI, o óleo essencial de tomilho utilizado nesta pesquisa foi submetido a análise de composição, realizado no departamento de química da Universidade Federal de Minas Gerais, por

cromatografia gasosa de alta resolução usando cromatógrafo a gás AGILENT 7820A. EC™ coluna: wax-10 30m x 0,32mm x 0,25 µm (Alltech®). Temperatura da coluna a 50°C (5 min), incrementando 3°C/min até 200°C. Injetor a 200°C *Split*: 1/50. Detector FID: 220°C. Volume de injeção de 1 µL a 2,0% (m/v) em acetato de etila. O tempo de corrida foi de 50 minutos. O perfil de composição e respectivos percentuais estão apresentados no anexo C.

5.1.3 Microrganismos

Os seguintes microrganismos foram cedidos das coleções dos departamentos de Antibióticos, Micologia e Nutrição da UFPE, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9028), *Candida albicans* (URM 6391) e *Colletotrichum gloeosporioides* (URM 5522).

5.2 Desenvolvimento e caracterização das emulsões base para coberturas comestíveis

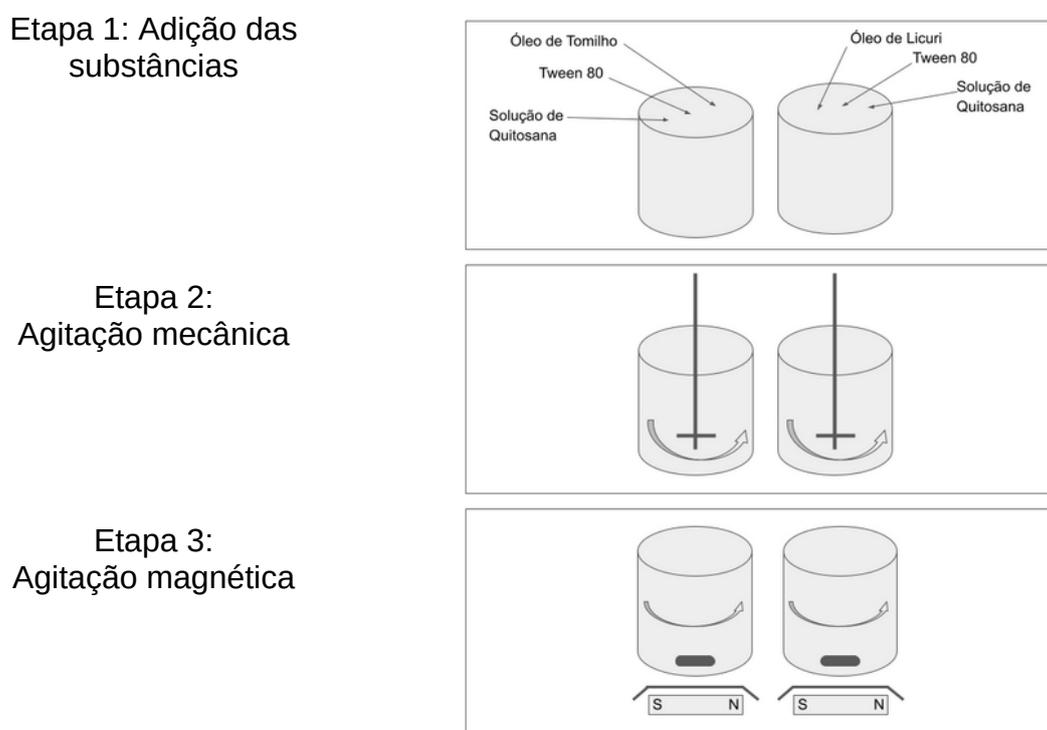
A produção das emulsões base seguiu os roteiros metodológicos de Rutz *et al.* (2017) e Gharanjig *et al.* (2020). Nesse sentido, em um béquer de 50 mL foi adicionado 25 mL solução de quitosana fúngica, a concentração de 1% (m/v), em solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v), 0,27 g de Tween 80 e 5% do óleo fixo de licuri ou óleo essencial de tomilho (Figura 7).

Em seguida esse conjunto foi emulsionado em um homogeneizador de alta velocidade Ultra-Turrax (T24, IKA®, Alemanha) a 9500 rpm por 8 minutos. Logo após a emulsão foi submetida a agitação magnética durante o período de 30 minutos a uma agitação constante de 500 rpm. As emulsões ficaram armazenadas por 24 horas sob refrigeração a 4°C para verificação visual da estabilidade das emulsões para em seguida serem submetidas às próximas etapas.

Após essa etapa as emulsões foram avaliadas quanto à sua caracterização físico-química, visando a avaliação de suas propriedades e o grau de emulsificação alcançado.

Foram mensurados o índice de polidispersão de cada sistema e tamanho das partículas em escala nanométrica utilizando o espalhamento dinâmico de luz (DLS) no comprimento de onda 633 nm, 25°C e ângulo de 90° e potencial zeta no Zetasizer (Nano-Zs, Malvern, UK). As amostras foram diluídas em água Milli-q® na proporção de 100 microlitros : 900 microlitros (amostra : água). Os resultados foram obtidos pela média aritmética de três medições realizadas. A verificação dessas cargas foi realizada no Zetasizer alterando seu modo “size” para o modo “zeta” e mantendo as mesmas características de angulação, temperatura e comprimento de onda.

Figura 7. Desenvolvimento das emulsões por agitação mecânica.



Fonte: Autoria própria.

5.3 Determinação de compostos polifenólicos totais

A quantificação de compostos fenólicos totais das emulsões foi realizada utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich®), em alinhamento com as metodologias de Waterhouse (2003) e Singleton e Rossi (1965). A curva de calibração foi realizada a partir da diluição seriada da solução de ácido gálico (Sigma-Aldrich®) na concentração de 200 µg/mL, até obter a concentração de 5 µg/mL. As amostras foram analisadas em duplicata no comprimento de onda de 760 nm em espectrofotômetro. Os valores de absorbância das amostras foram convertidos em equivalente de ácido gálico por grama da amostra.

5.4 Potencial de irritabilidade pelo método Het-Cam

O potencial de irritação das coberturas foi avaliado por meio do teste da membrana corioalantoide do ovo de galinha fecundado (HET-CAM), utilizando microscópio digital (CORRÊA *et al.* 2023; LUEPKE, 1985). Os ovos fecundados foram adquiridos da Mauricéa Alimentos do Nordeste Ltda. Após o primeiro dia da postura, os ovos foram mantidos em estufa BOD a 37°C durante seis dias até que os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário possibilitaram as análises. Os ensaios foram realizados em sextuplicata.

Foram testados, além das emulsões, a mistura de cada óleo com tween 80 em base de água nas mesmas concentrações das emulsões. Grupos controles contendo apenas soro fisiológico (NaCl 0.9%) (controle negativo), apenas quitosana fúngica 1% (m/v) e apenas lauril sulfato de sódio 1% (m/v) (controle positivo) foram testados com a finalidade de comparação visual com os grupos contendo os óleos essenciais. O volume de 0,1 mL de cada uma dessas soluções foi adicionado sobre a membrana corioalantoide e os possíveis efeitos irritantes, hemorragia, formação de coágulos e hiperemia, foram analisados durante cinco minutos.

5.5 Determinação das concentrações inibitórias mínimas das emulsões

Os microrganismos foram manipulados de forma semelhante à metodologia de Gudiña e colaboradores (2010). Foi utilizado o meio de cultura *Brain-Heart Infusion* (BHI) para as cepas bacterianas testadas, incubadas durante 18h a 37°C, enquanto para *C. albicans* foi utilizado o meio *Sabouraud*, com incubação durante 24h a 37°C. Após a incubação, uma alíquota de 100 µL de cada microrganismo foi transferida para solução salina 0,9% estéril. Para *C. gloeosporioides* foi utilizado o meio *Sabouraud* com incubação em placa por sete dias.

A capacidade das emulsões de reduzir a viabilidade celular dos microrganismos testados foi feita a partir da metodologia da concentração inibitória por microdiluição. As cepas bacterianas e *C. albicans* foram inoculadas em microplaca de 96 poços, em diferentes concentrações das emulsões (de 0 até 600 µL/mL) meio de cultura caldo BHI para os microrganismos *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e meio caldo *Sabouraud* para *C. albicans*.

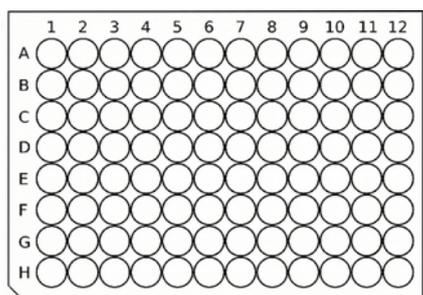
Por fim, foi adicionado o inóculo, padronizado na escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), de cada microrganismo. Os microrganismos foram incubados por 24h a 37°C, e depois foi realizada a revelação da viabilidade celular utilizando o corante resazurina (30 µL em cada poço) com o intuito de verificar se havia atividade de redução para resorufina promovendo a alteração de cor de roxo para rosa (células viáveis). A distribuição dos volumes do meio de cultura, emulsões e inóculo, totalizaram volume final de 100 µL é visível na tabela 1.

Para *C. gloeosporioides* foi utilizada a técnica de macrodiluição em tubo de ensaio, contendo as concentrações das emulsões variando de 0 a 600 µL/mL, caldo *Sabouraud* e pré-inóculo, totalizando volume final de 1mL. O pré-inóculo foi padronizado em (10^6 esporos/mL). *C. gloeosporioides* foi incubado a 25°C por 7 dias. As análises foram realizadas em triplicata.

Após preparo das microplacas/tubos de ensaio, antes e após o período de incubação, para cada microrganismo foi procedida a leitura da densidade óptica em leitor de microplacas (Biorad 680, Hercules, California, EUA) no comprimento de onda 550 nm. Para *C. gloeosporioides* a leitura da densidade óptica foi realizada a cada 24 horas até completar os 7 dias de incubação.

Tabela 1. Determinação das concentrações inibitórias mínimas das emulsões.

Poço	Substância teste $\mu\text{l/ml}$	Meio de cultura $\mu\text{l/ml}$	Inóculo $\mu\text{l/ml}$	Volume final do poço μl	Concentração final de óleo $\mu\text{l/ml}$
A	600	200	200	100	30
B	500	300	200	100	25
C	400	400	200	100	20
D	300	500	200	100	15
E	200	600	200	100	10
F	100	700	200	100	5

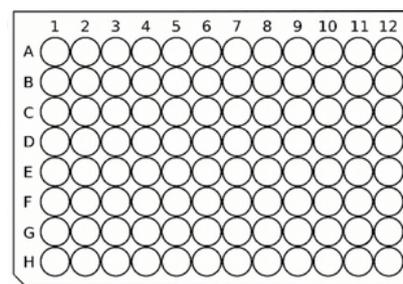


Emulsão Licuri 5%

Colunas 1 e 2:
S. aureus

Colunas 3 e 4:
E. faecalis

Colunas 7 e 8: *P. aeruginosa* Colunas: 9 e 10: *C. albicans*



Emulsão Tomilho 5%

Colunas 5 e 6:
E. coli

Fonte: Autoria própria.

A taxa de inibição microbiana em percentual foi calculada pela diferença entre a média das densidades ópticas aferidas no fim da incubação subtraída do valor aferido antes da incubação dividido pelo valor antes da incubação, conforme expressão a seguir:

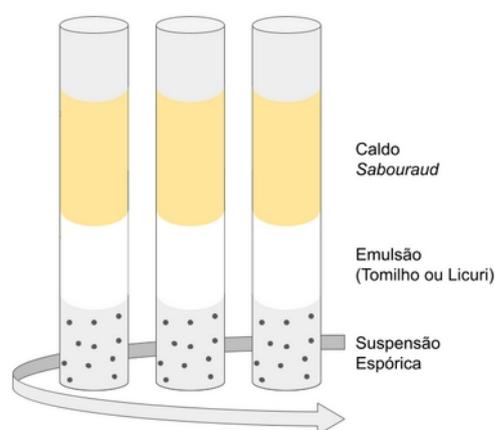
$$\% = \frac{(\text{média após incubação}) - (\text{média antes da incubação})}{(\text{média antes da incubação})}$$

5.6 Potencial de alteração morfológica das emulsões no crescimento fúngico

A visualização das alterações morfológicas provocadas pelas coberturas no crescimento do *C. gloeosporioides* foi obtida por meio da técnica de microcultivo fúngico em meio líquido, adaptado de Riddell (1950).

Em tubos de ensaio foram adicionados, para a emulsão do óleo fixo de licuri, 1,4 mL de caldo *Sabouraud*, 200 μ L da emulsão e 400 μ L de suspensão espórica do *C. gloeosporioides*. Já para a emulsão do óleo essencial de tomilho foram adicionados 1,5 mL de caldo *Sabouraud*, 100 μ L da emulsão e 400 μ L de suspensão espórica, conforme figura 8. Após isso, os tubos foram submetidos à agitação orbital por três dias a 150 rpm a 28°C. As análises foram realizadas em duplicata.

Figura 8: Esquema de preparo do microcultivo para *C. gloeosporioides* em meio líquido sob ação das emulsões.



Fonte: Autoria própria.

Essas concentrações foram definidas a partir da $\frac{1}{2}$ concentração inibitória mínima (CIM) da emulsão do licuri e $\frac{1}{4}$ para a emulsão do tomilho. Esses valores foram definidos abaixo da CIM, pois o objetivo foi de visualizar a capacidade das emulsões em alterar a morfologia do fungo e assim provocar sua morte e se a concentração estivesse muito próxima a CIM não haveria crescimento.

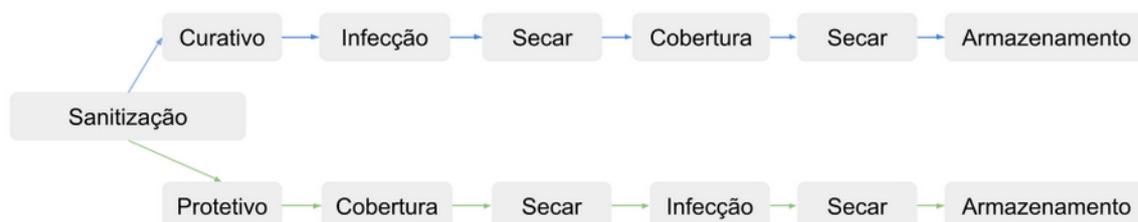
Após três dias, uma alíquota foi retirada para visualização óptica. Um fragmento de biomassa fúngica foi corado em lâmina para microscopia usando o lactofenol azul algodão (Azul Aman) e então foi visualizada em microscópio óptico.

5.7 Aplicação das coberturas no caju

As coberturas preparadas, a partir da CIM das emulsões obtidas, foram adicionadas de glicerol a 1% com o intuito de melhorar a performance plástica do revestimento e então filtradas em filtro de membrana 42 nm em ambiente asséptico.

Após essa primeira etapa, os caju foram sanitizados conforme Brasil (2004), mergulhados em recipientes contendo solução de hipoclorito de sódio 1%(v/v) durante 15 minutos, em seguida foram enxaguados com água potável e deixados para secagem à temperatura ambiente por um período de 30 minutos para remoção da água residual. Depois disso, os caju foram divididos em 2 grupos (figura 9) quanto a função da cobertura: Grupo 1- Tratamento no qual os caju foram inicialmente infectados com o fungo e depois receberam a cobertura; Grupo 2- Preventivo, no qual os frutos foram inicialmente cobertos com as coberturas testes e depois foram contaminados com o fungo.

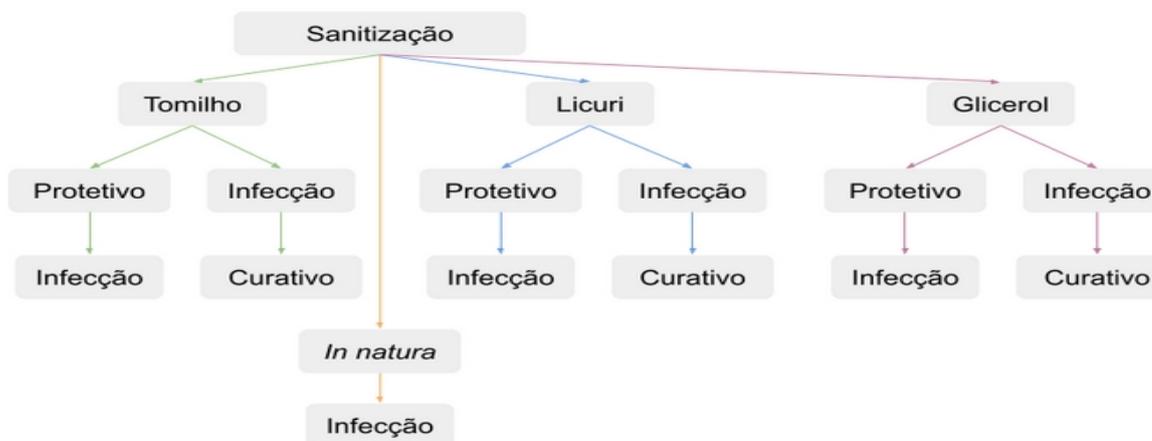
Figura 9: Divisão dos frutos por tipo de tratamento que receberam.



Fonte: Autoria Própria.

Em seguida, os caju foram divididos em 3 grupos (Figura 10) quanto as coberturas, Grupo A- controle negativo, *in natura* foi apenas sanitizado e submetido ao mesmo armazenamento a fim de acompanhar e comparar a senescência dos caju; Grupo B- foram imersos em uma solução formada pelo plastificante glicerol 1% (v/v); Grupo C- foram cobertos com as emulsões testes.

Figura 10: Grupos de aplicação das coberturas e infecções.



Fonte: Autoria Própria.

A infecção com *C. gloeosporioides* ocorreu por pincelamento da suspensão salina fúngica contendo os esporos do *C. gloeosporioides* e deixados secar por mais 30 minutos. Cada pedúnculo foi recoberto (recebeu as coberturas) sendo submerso por 60 segundos em cada emulsão/glicerol 1% e deixado secar por 30 minutos (Figura 11).

Após aplicação das coberturas, para prevenção ou tratamento da infecção fúngica, os frutos foram deixados para secagem por 30 minutos a fim de drenar o excesso de líquido das amostras e em seguida foram armazenados separadamente por grupos, em recipientes de polietileno ou inox, em temperatura ambiente (25 °C) em estufa BOD, conforme figura 12. Cada grupo era constituído por cinco cajus.

Os cajus foram avaliados quanto a presença de infecção fúngica visível a cada 24h. Todos os grupos foram analisados em conjunto com a finalidade de garantir que os resultados obtidos foram produzidos pela adição das coberturas testes. Os resultados foram expressos em percentual de fruta infectada (SHAHBAZI, 2018; MELO *et al.*, 2018). Foi verificado a capacidade do revestimento em manter a massa do produto, usando balança semi-analítica, bem como foi comparado o estágio de senescência dos dois grupos e o poder de retardar o crescimento fúngico do *C. gloeosporioides*.

Figura 11: Etapas das aplicações das coberturas por imersão (A) e infecção por pincelamento (B).

A



B



Fonte: Autoria Própria.

As frutas foram fotografadas e pesadas diariamente durante o tempo de armazenamento. O tempo de armazenamento de cada grupo foi conduzido até que a parte visível do fungo ocupasse toda a área do pedúnculo.

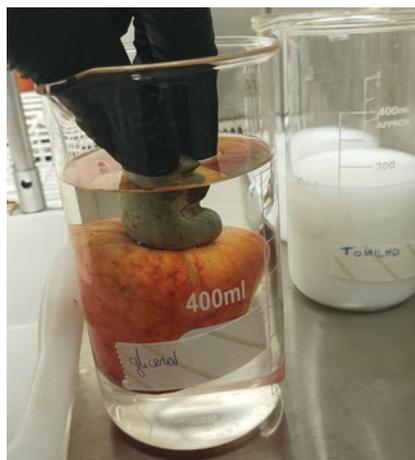
Figura 12: Etapas de secagem em ambiente acéptico(A), armazenamento em estufa BOD (B) e aplicação por imersão(C).

A



B

C



Fonte: Autoria própria.

5.8 Análises estatísticas

Os ensaios foram realizados em triplicata ou mais repetições e os resultados foram trabalhados conforme suas médias aritméticas e desvios padrão. Quando necessário, foram usados testes estatísticos *t student* para determinação de diferenças significantes ($p < 0,05$). Para o tratamento estatístico foi usado o software Sigmastat versão 3.5.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Caracterização físico-química das emulsões

Uma emulsão é o resultado da mistura de duas substâncias que, sem intervenção, não ficariam homogêneas. Ela é considerada uma dispersão coloidal onde uma fase será a fase contínua que receberá a fase dispersada em seu seio formando um sistema metaestável. A estabilidade da emulsão está relacionada ao tamanho dessas gotículas e ao tempo em que elas conseguirão manter-se dispersas. Já as cargas eletrostáticas na superfície das partículas dispersas são responsáveis por manter as gotículas afastadas, por meio das forças de repulsão eletrostáticas, umas das outras e dessa forma promover a estabilização na fase dispersante (ZHAO; LAN; XIE, 2023).

As emulsões produzidas apresentaram-se na coloração branco opaco, estáveis e sem separação dos óleos da base aquosa, durante o período em que as análises foram conduzidas, conforme é possível ver na figura 6.

A emulsão que continha óleo fixo de licuri apresentou menor tamanho de partícula, menor índice de polidispersão e maior potencial zeta, conforme tabela 2, e foi considerada potencialmente mais estável. Esta emulsão alcançou o tamanho de partículas na escala de nanometro, sendo considerada nanoemulsão, enquanto que a emulsão que continha óleo essencial de tomilho obteve tamanho na escala de micrometro, sendo considerada microemulsão.

Bastos (2017), utilizando metodologia similar, também alega alcançar tamanho de partícula na escala nanométrica (83,85 nm ($\pm 2,0$)), além disso o índice de polidispersão também foi similar ao encontrado nesta pesquisa (0,287 ($\pm 0,3$)). Contudo, os resultados de potencial zeta descritos por Bastos foram menores (9,3 mV ($\pm 0,73$)) do que os registrados nessa pesquisa e este pode ser um indicativo de que a emulsão alcançada nesta pesquisa apresentou maior estabilidade, uma vez que, um maior potencial zeta indica que as partículas se repeliam com maior intensidade.

Com o objetivo de avaliar o potencial emoliente do óleo de licuri frente ao já consagrado óleo de amêndoas doce, Leal e colaboradores (2013), utilizando metodologia diferente desta pesquisa com maior concentração do óleo e aquecendo

a mistura, emulsionaram a partir da agitação mecânica a 900 rpm por 20 minutos e atingiram tamanho de partícula na escala de micrômetros (2,4 μm) e estabilidade por até 90 dias.

Com base nos resultados do teste t Student performedo, pode-se rejeitar a hipótese nula de que as médias dos dois grupos eram iguais e aceitar a hipótese alternativa. Dessa forma, houve evidências estatísticas suficientes para concluir que as médias dos parâmetros físico-químicos das emulsões eram independentes.

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos das emulsões.

	Tamanho de partícula nm ($p < 0,05$)	Índice de polidispersão ($p < 0,05$)	Potencial zeta ($p < 0,05$)
Emulsão de Licuri	444.07 \pm 3.93	0,285 \pm 0,01	50,53 \pm 0.29
Emulsão de Tomilho	997.63 \pm 82.41	0,8145 \pm 0,04	43.61 \pm 1,17

Fonte: Autoria própria.

Piñero e colaboradores (2019), ao avaliar o grau de emulsificação do óleo essencial de tomilho no surfactante *Appyclean*® em diferentes temperaturas, registraram tamanhos de partícula similares (1.05 \pm 0.1 μm) aos alcançados nesta pesquisa na faixa de micrômetro. Assim como Al-Moghazy e colaboradores (2021) também alcançaram o tamanho de partículas em 77 μm utilizando metodologia similar à usada nesta pesquisa.

Ghoshal e Thakur (2022), ao produzirem emulsões com óleo essencial de tomilho, conseguiram estabilizar a mistura com tamanho de partícula menor, 12,03nm \pm 0,12 na concentração de 5% do óleo e menor índice de polidispersão, o que indica que a emulsão produzida pela dupla estava mais dispersa. Contudo, a metodologia utilizada empregou o uso de um emulsificador ultrassônico, o que pode ter levado aos melhores resultados encontrados por eles comparados aos registrados nesta pesquisa.

6.2 Determinação da composição de polifenóis

O total de compostos fenólicos da emulsão base com óleo fixo de licuri em associação com a quitosana fúngica foi de 0,0638 ($\pm 0,035$) mg GAE/g. Por outro lado, a emulsão base com óleo de tomilho associado com a mesma quitosana indicou um total de 0,3424 ($\pm 0,082$) mg GAE/g.

A emulsão que contém o óleo de tomilho apresentou maior teor de compostos fenólicos e esse fato corrobora sua também maior ação antimicrobiana descrita no subitem 6.4, haja vista que esses fitoquímicos são também responsáveis por provocar a morte celular.

A confirmação de que o *terroir* é fator determinante na composição de compostos fenólicos presente no tomilho foi registrada por Rivera-Pérez e colaboradores (2022), que analisaram em base seca tomilho oriundo de três nacionalidades e verificaram que o perfil de ácidos fenólicos variou conforme origem. As amostras da Espanha e da Polônia indicaram possuir aproximadamente 0,3 mg Eq AG/g, resultados similares aos encontrados nesta pesquisa, enquanto que o tomilho de origem marroquina apresentou concentração superior, ultrapassando 0,5 mg Eq AG/g.

Registros científicos recentes acerca da composição fenólica do licuri ainda são escassos na literatura. O total de compostos fenólicos presentes na farinha de licuri foi descrito, por exemplo, há uma década por Belviso e colaboradores (2013). A equipe comparou as farinhas torrada e crua do fruto e comprovaram que a torra aumenta a concentração de compostos fenólicos totais em 2,2 vezes.

O óleo utilizado nesta pesquisa foi produzido sem tratamento térmico e dessa forma pode-se traçar um paralelo entre a farinha crua, que não recebeu tratamento térmico, analisada pela equipe. Em termos percentuais o óleo fixo de licuri indicou possuir 5,25% do total de compostos fenólicos indicados pela farinha crua analisada por Belviso e col. (2013) o que denota que o óleo não retém a maior parte desses compostos, que devem permanecer no seu resíduo sólido.

6.3 Potencial de irritabilidade pelo método Het-Cam

O potencial de irritabilidade das emulsões foi avaliado e pode ser visualizado na figura 13. A coloração leitosa das emulsões dificultou a percepção do teste, pois tornou algumas áreas opacas.

Constatou-se que o uso do soro fisiológico não causa sensibilidade na membrana corioalantóica mesmo após os cinco minutos de exposição, confirmando-o como um bom controle negativo, como é possível visualizar nas figuras 13a e 13b. Ao passo que o uso do lauril 1% causa danos severos, lise, coágulo e hemorragia. O que o confirma como um excelente controle positivo, conforme figuras 13c e 13d.

A mistura de óleo essencial de tomilho associado ao tween 80, figuras 13e e 13f, apresentou vasoconstrição nos capilares da membrana corioalantóica, mas não apresentou hemorragia, hiperemia ou coágulos. É possível observar na seta azul fixada na imagem que a quantidade de capilares é reduzida significativamente.

A cobertura que continha o óleo essencial de tomilho, diferentemente da mistura mencionada no parágrafo anterior, não apresentou vasoconstrição durante a análise, contudo é possível identificar na seta azul fixada nas imagens, figuras 13g e 13h, a formação de hemorragia após 2:30 minutos, o que segundo a escala de Luepke, enquadra a solução como moderadamente irritante. Por outro lado, Chelliah e colaboradores (2023) não identificaram nenhum potencial irritante na emulsão contendo óleo essencial de tomilho. Contudo a composição do óleo essencial de tomilho avaliado pela equipe difere bastante do óleo usado nesta pesquisa, por exemplo há menos de 1% de Y-terpineno no óleo usado pela equipe enquanto que há mais de 18% no óleo usado nesta pesquisa. Também não há percentual de p-cimeno no óleo usado por eles, enquanto que há mais de 25% no óleo usado nesta pesquisa.

A mistura de óleo fixo de licuri associado ao tween 80 não apresentou vasoconstrição, formação de coágulos ou hemorragias. Contudo, manifestou hiperemia após 2:30 minutos, conforme figura 13i e 13j no centro inferior da imagem. Segundo a escala de Luepke tal solução está classificada como levemente irritante.

A cobertura que continha óleo fixo de licuri não apresentou hiperemia, formação de coágulos ou hemorragias. Contudo, apresentou vasoconstrição de

capilares após 3 minutos de análise, sendo possível ser observada na metade direita das figuras 13k e 13l, resultados similares foram observados por Bastos (2017).

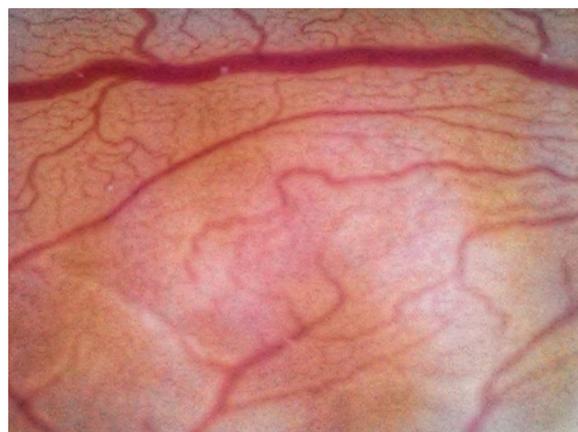
O aspecto leitoso e opaco ficou em especial mais evidente nessas últimas imagens e reitera a importância de se conduzir distintas análises de toxicidade. Entretanto, os resultados de irritabilidade preliminares trazidos neste registro são, tanto quanto pode-se averiguar, pioneiros na elucidação do potencial de irritação que esses óleos podem causar e servirão como local de partida para futuras pesquisas.

Figura 13: Membranas corioalantóicas reagindo a diferentes soluções. Soro fisiológico (A). Soro fisiológico após 5 minutos (B). Lauril 1% (C). Lauril 1% após 5 minutos (D). Óleo (tomilho) + Tween 80 (E). Óleo (tomilho) + Tween 80 após 5 minutos (F). Cobertura (tomilho) (G). Cobertura (tomilho) após 2,5 minutos (H). Óleo (licuri) + Tween 80 (I). Óleo (licuri) + Tween 80 após 5 minutos (J). Cobertura (licuri) (K). Cobertura (licuri) após 5 minutos (L)

A



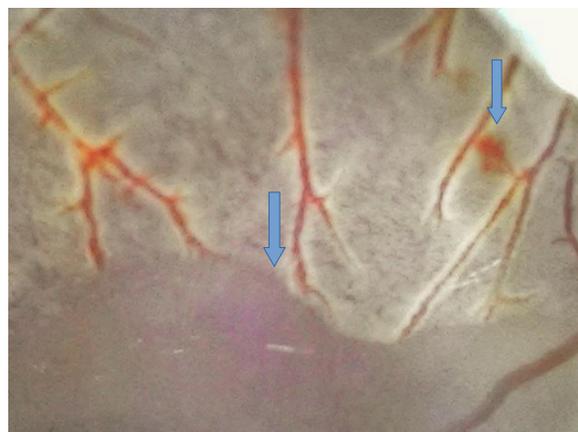
B



C



D



E



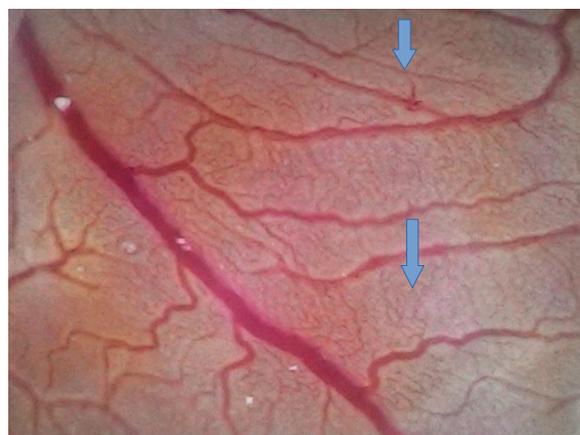
F



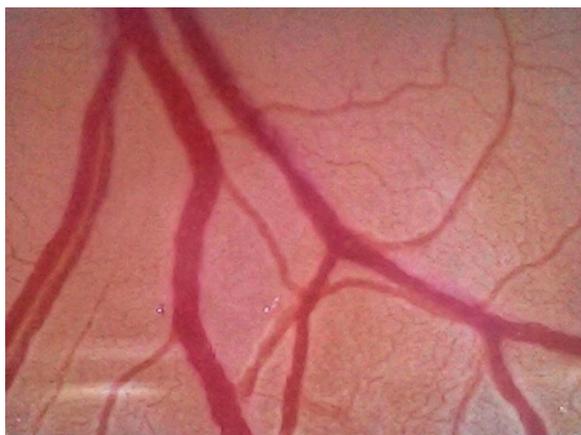
G



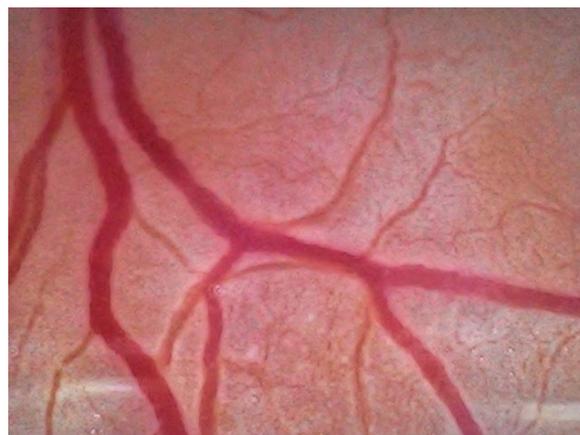
H

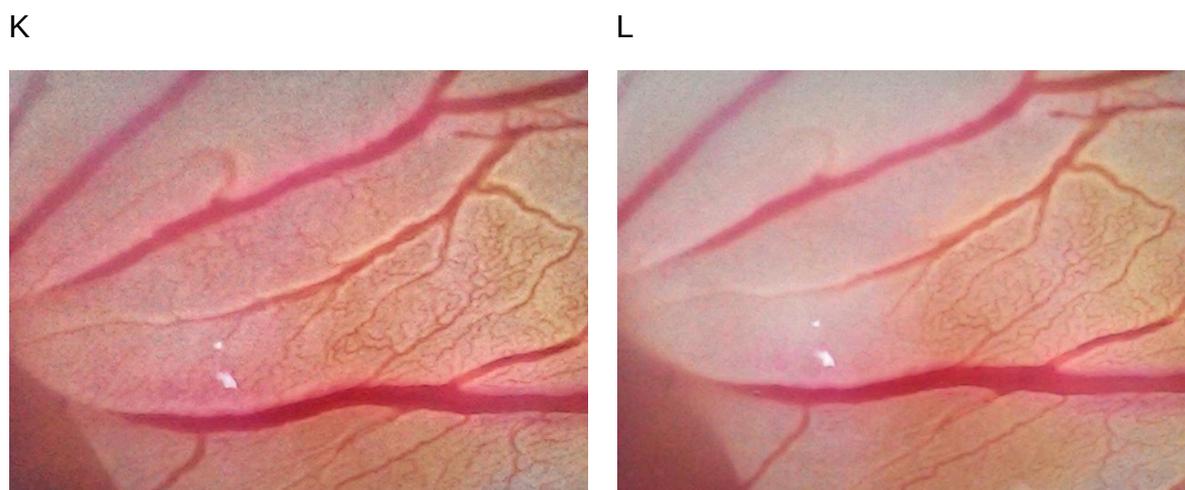


I



J





Fonte: Autoria própria.

6.4 Concentrações inibitórias mínimas das emulsões

6.4.1 Atividade antimicrobiana das emulsões para os patógenos

Em linhas gerais a ação microbiana dos óleos essenciais ocorre pelo desequilíbrio eletrostático, resultante da interação entre os metabólitos secundários presentes neles e a membrana celular, que ao romper-se provoca vazamento do conteúdo citoplasmático e sua morte (KIANE, ARZANI E MAIBODY 2021).

Ambas as formulações conseguiram inibir o crescimento dos microrganismos testadas em diferentes concentrações, conforme tabela 3, onde o percentual 0% representa crescimento celular. A emulsão formulada com óleo de tomilho obteve maior capacidade de reduzir o crescimento microbiano para as 4 primeiras cepas avaliadas, exceto para *C. albicans* que teve mais sensibilidade para emulsão formulada com óleo fixo de licuri na concentração de 300 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

A composição do óleo essencial de tomilho, com alto percentual de timol, corrobora para essa ação antimicrobiana mais intensa nesta emulsão, uma vez que, esta molécula possui tal ação confirmada previamente contra uma grande variedade de microrganismos (SIM, et al. 2019; ZHANG, et al. 2023; GOODARZI, et al. 2023).

A leitura das densidades ópticas, após o período de incubação, indicou quais concentrações das emulsões mostraram atividade antimicrobiana. Em relação à

emulsão de óleo essencial de Tomilho, *S. aureus* e *C. albicans* mostraram-se sensíveis já na menor concentração analisada, 100 µL/mL. Já para *E. faecalis* e *P. aeruginosa* a concentração necessária para ação bactericida foi de 200 µL/mL. Enquanto que *E. coli* mostrou a maior resistência dentre os microrganismos analisados, pois a concentração necessária para ação bactericida foi de 400 µL/mL, resultados similares encontrados por Moradi e Barati (2019).

Tabela 3. Concentração inibitória mínima das emulsões base após 24h a 37°C.

Emulsão com óleo essencial de tomilho					
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
	100 µL/mL	200 µL/mL	300 µL/mL	200 µL/mL	400 µL/mL
Controle	0%	0%	0%	0%	0%
Emulsão com óleo fixo de licuri					
	300 µL/mL	400 µL/mL	300 µL/mL	400 µL/mL	100 µL/mL
Controle	0%	0%	0%	0%	0%

Fonte: Autoria própria.

No que se refere a emulsão do óleo fixo de licuri *C. albicans* mostrou a maior sensibilidade, bastando que a concentração da emulsão fosse de 100 µL/ml para verificação de ação antimicrobiana, resultados similares aos descritos por Bastos (2017). Para as bactérias *P. aeruginosa* e *E. coli*, 300 µL/mL de emulsão foram necessários, para *E. faecalis* 40 µL/mL e para *S. aureus* 500 µL/mL de emulsão, sendo essa última a menos sensível. Bastos (2017), usando 1% de óleo de licuri emulsionado não verificou ação bactericida para a *E. coli* e ainda 15 µg/mL foram suficientes para ação bactericida para o *S. aureus*, tais resultados diferem dos encontrados nesta pesquisa.

Investigações acerca da capacidade do óleo de licuri em inibir o crescimento microbiano ainda tem despertado pouco interesse científico. Poucos registros foram feitos até então, um desses foi realizado por Bessa e colaboradores (2016) que

compararam as capacidades do óleo essencial de licuri e do óleo fixo de licuri de inibir o crescimento do *S. aureus*. Para o óleo essencial a concentração mínima inibitória variou entre 0.002 $\mu\text{L/mL}$ até 0.08 $\mu\text{L/mL}$. Para o óleo retificado a concentração variou entre 0.16 $\mu\text{L/mL}$ até 2.5 $\mu\text{L/mL}$. A baixa concentração inibitória encontrada pela equipe, comparada com a concentração encontrada nesta pesquisa, ocorre pois nesta pesquisa não foi usado o óleo puro, mas sim um percentual de diluição de 5% no volume da emulsão.

Por outro lado, a emulsão composta pelo óleo fixo de licuri conseguiu taxa similar de inibição da *C. albicans* com metade da concentração requerida pela emulsão do óleo essencial de tomilho. Para os demais microrganismos, essa emulsão mostrou-se menos eficiente em reduzir o crescimento microbiano. Conforme tabela 4, este óleo possui maior concentração de ácido láurico em sua composição, tal composto é conhecido por sua ação antimicrobiana. Dessa forma, a capacidade de inibir os microrganismos analisados pode ser associada, mas não limitada, à sensibilidade do microrganismo frente ao ácido láurico (HOA et al., 2022; SOUZA et al., 2021; KUMAR et al. 2020).

Tabela 4: Composição do óleo fixo de licuri

Compostos	Conteúdo em %
Ácido caprílico	10,05 \pm 0,11
Ácido cáprico	6,40 \pm 0,08
Ácido láurico	43,64 \pm 0,62
Ácido mirístico	14,32 \pm 0,22
Ácido palmítico	6,89 \pm 0,13
Ácido esteárico	3,83 \pm 0,03
Ácido oleico	11,78 \pm 0,52
Ácido linoleico	3,10 \pm 0,38

Fonte: Souza 2021.

O óleo essencial de tomilho utilizado nesta pesquisa possui em sua composição p-cimeno (25,4%) e y-terpineno (18,6%), que isolados apresentam baixa atividade antimicrobiana. Contudo, quando em sinergia com timol (49,4%), linalol (0,2%) e carvacrol (0,4%) possuem conhecida ação antimicrobiana contra *S. aureus*, *Salmonella* spp, *E. coli*, *Botryodiplodia theobromae* e *Colletotrichum gloeosporioides*. A ação antimicrobiana demonstrada pela emulsão que contém o óleo essencial de tomilho pode ter sido derivada da presença desses compostos e a sensibilidade dos microrganismos a esses compostos (MIRSHARIFI *et al.* 2023; CAI *et al.* 2020; ZHANG *et al.* 2020).

Embora resultados similares de concentração e composição do óleo essencial de tomilho tenham sido descritos por Mukurumbira e col. (2023) a composição dos óleos essenciais em geral varia conforme região de plantio, técnicas agrícolas e safra, pois seus compostos aromáticos são parte dos metabólitos secundários das plantas. Além disso as técnicas de extração também alteram a composição dos produtos, tal ação antimicrobiana está condicionada à origem e qualidade do produto (JAOUADI; BOUSSAID; ZAOUALIVARIATION, 2023; SANTOS *et al.* 2023).

Além disso, a falta de legislação e regulamentação da produção de óleos essenciais também colabora com a não padronização dos produtos no mercado brasileiro o que reforça a imprescindibilidade de se obter óleos essenciais fornecidos por marcas responsáveis. Atualmente a categoria de produtos dos óleos essenciais está entendida como produtos cosméticos com classificação de risco I. Isso quer dizer que o licenciamento realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é apenas notificado e não registrado pela agência, ou seja, sequer existe a necessidade de comprovação das eficácias alegadas (BRASIL, 2022; BRASIL, 2014).

Soleimani e colaboradores (2022) em sua meta-análise indicaram que o óleo essencial de tomilho possui ação antimicrobiana contra os cinco microrganismos testados nesta etapa. Contudo há variações nas concentrações inibitórias mínimas em cada referência compilada. Tais variações devem-se ao fato descrito por Santos e colaboradores (2023) referente às mudanças nas composições entre cada marca, derivada do *terroir* do plantio, e a ausência de regras de padronização dos produtos.

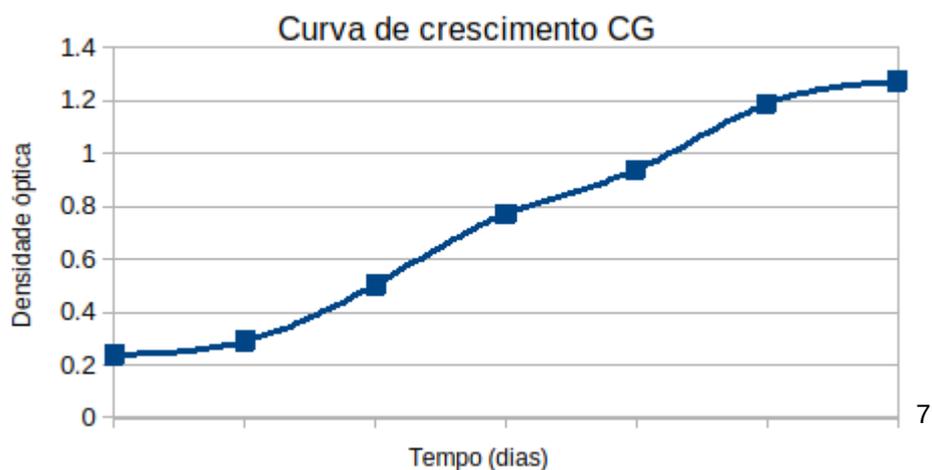
S. aureus mostrou-se particularmente sensível à emulsão do óleo essencial de tomilho apresentando taxa inibição já na concentração de 200 $\mu\text{L/mL}$, frente a crescimento celular registrado no experimento com óleo fixo de licuri para a mesma concentração, resultados similares foram descritos por Ghoshal e Thakur (2022). Essa ação, decorre ao fato de o timol atuar na lise da membrana celular de gram positivas favorecendo o vazamento do conteúdo citoplasmático e também explica a maior resistência da *E. coli* a essa emulsão.

O timol, molécula de maior prevalência na composição do óleo essencial de tomilho utilizado, possui ação antimicrobiana vastamente analisada na literatura científica (REF). A esta concentração credita-se as ações antimicrobianas encontradas nesta pesquisa, que foi inclusive mais eficiente contra as quatro bactérias e em menor concentração. Da mesma maneira que também credita-se a esta maior presença do timol as alterações morfológicas em maior intensidade no crescimento do *C. gloeosporioides*, item 6.5.

6.4.2 Crescimento microbiano de *C. gloeosporioides* em presença das emulsões

Foi possível verificar a viabilidade do fungo a partir da curva de crescimento microbiana utilizando as leituras de densidade óptica verificadas durante o experimento com o grupo controle, assim como mostrado na figura 14.

Figura 14: Curva de crescimento microbiano do *C. gloeosporioides*

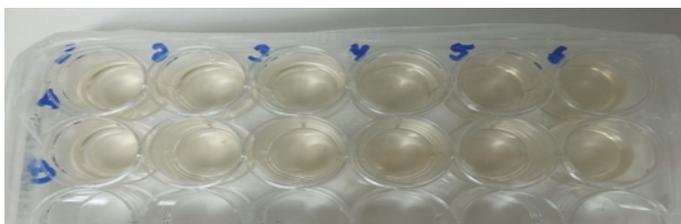


Fonte: Autoria própria.

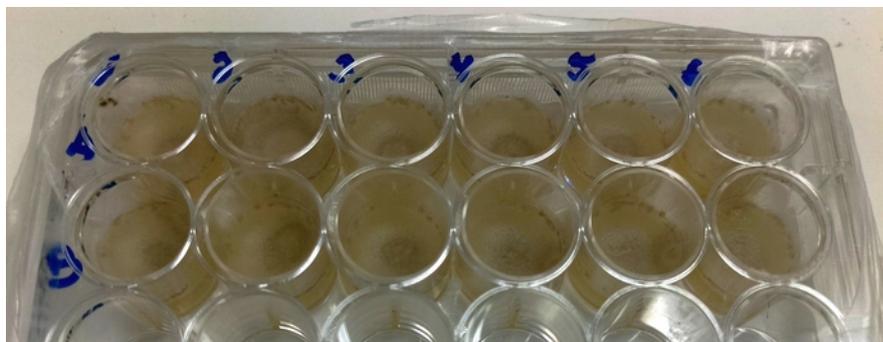
A verificação do potencial de inibição contra *C. gloeosporioides* das duas emulsões mostrou-se positiva em diferentes concentrações e tempos de incubação. Comprovou-se que todos os poços que continham alguma emulsão permaneceram no estado líquido durante o tempo de incubação, enquanto que o grupo controle tornou-se sólido. Ao final do experimento apenas o grupo controle apresentava sinais visíveis de esporulação, tais indicações estão demonstradas na figura 15.

Figura 15: Dia 0 (A) e Dia 7 das inoculações em meio *Sabouraud* do *C. gloeosporioides* (B). Dia 0 (C) e Dia 7 das inoculações em presença das emulsões do *C. gloeosporioides* (D).

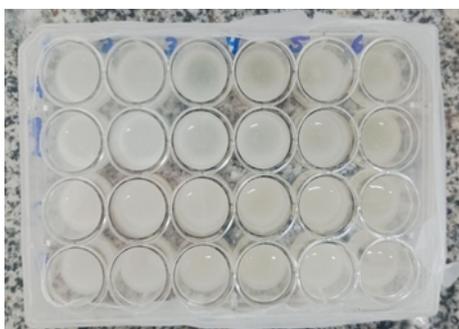
A



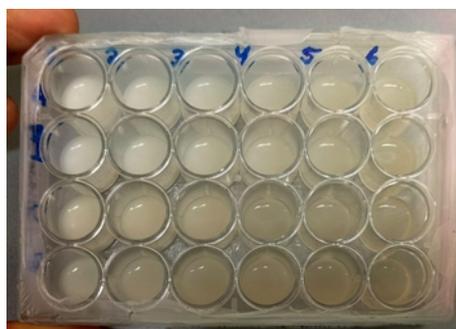
B



C



D



Fonte: Autoria própria.

6.4.3 Atividade antimicrobiana para *C. gloeosporioides*

A emulsão produzida com óleo essencial de tomilho mostrou-se fungicida contra *C. gloeosporioides* em todas as concentrações verificadas durante os três primeiros dias. A partir do terceiro dia não houve mais atividade fungicida, mas sim fungistático, uma vez que a densidade óptica manteve-se estável a partir desse dia. Sarkhosh e colaboradores testaram a ação fungicida do óleo essencial de tomilho, contra esse fungo, aplicado em abacates infectados (2017a) e mamão papaia (2017b) também verificaram atividade antifúngica, foi usado pela equipe a concentração de 2000 $\mu\text{L.L}^{-1}$ para o abacate e 125 $\mu\text{L.L}^{-1}$ para o mamão papaia, contudo nesta pesquisa a concentração de 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ já mostrou-se fungicida.

Já a emulsão que continha óleo fixo de licuri mostrou-se fungistática durante os cinco primeiros dias e após esse período sua ação fungicida atingiu seu pico no sétimo dia de análise. Até onde pode-se observar não há registros na literatura quando a capacidade fungicida do óleo fixo de licuri contra *C. gloeosporioides*.

A taxa de inibição fúngica, como pode ser vista na tabela 5, foi conferida após o período de crescimento microbiano. Foi possível constatar que em todas as concentrações analisadas houve inibição microbiana.

Tabela 5: Taxa de inibição do *C. gloeosporioides* nas emulsões base após 7 dias.

Concentrações	600 $\mu\text{L/mL}$	500 $\mu\text{L/mL}$	400 $\mu\text{L/mL}$	300 $\mu\text{L/mL}$	200 $\mu\text{L/mL}$	100 $\mu\text{L/mL}$
Tomilho	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Licuri	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Fonte: Autoria própria.

6.5 Potencial das emulsões em causar alteração morfológica no crescimento do *C. gloeosporioides*

Os resultados da análise morfológica do micélio de *C. gloeosporioides* tratados com as emulsões de licuri e tomilho, nas concentrações de 100 $\mu\text{L/mL}$ de emulsão de licuri e 50 $\mu\text{L/mL}$ de emulsão de tomilho, são apresentados na Figura 16. No micélio controle, sem o tratamento com os óleos (Figura 16a), pode-se observar hifas lineares e com citoplasma homogêneo. Por sua vez, o micélio tratado com emulsão de licuri (Figura 16b), apresentou hifas finas, distorcidas, atrofiadas e sem coloração, evidenciando perda de conteúdo citoplasmático. O tratamento com a emulsão de tomilho (Figura 16c) induziu alterações morfológicas similares, embora mais intensas, como hifas curtas, finas, distorcidas, fragmentadas e sem coloração citoplasmática.

A compreensão de como ocorre a atividade antifúngica das emulsões contra o *C. gloeosporioides* pode ser visualizada por meio do microcultivo em meio líquido, pois essa técnica permite que as características morfológicas das hifas e dos corpos de reprodução sejam identificadas, registrados e comparados. O mecanismo de ação antifúngica pode ser creditado a desestabilização eletrostática da membrana celular, aumento da permeabilidade da membrana e vazamento do conteúdo citoplasmático (FERNANDES *et al.* 2023). Dessa forma, a atividade antimicrobiana contra o *C. gloeosporioides* está relacionada à sensibilidade do fungo com a composição dos óleos utilizados, anexo C e tabela 4.

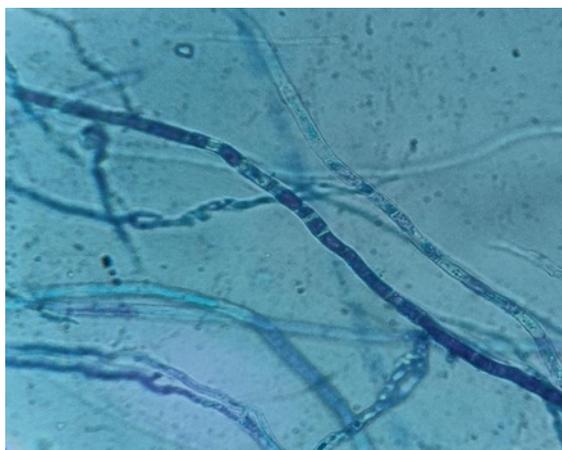
O timol, maior componente presente na composição do óleo essencial de tomilho utilizado, está diretamente relacionado a capacidade mais pujante da emulsão que o contém de alterar as estruturas do microrganismo. Essa sua ação foi analisada por Al-Kandari e colaboradores (2019) frente ao crescimento de *E. coli* e ratificada que a concentração de 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ como a concentração inibitória mínima e causadora de modificações morfológicas na membrana celular que a fez evoluir para a morte celular.

Santos e colaboradores (2021) ao avaliarem a ação antifúngica dos óleos essenciais de eucalipto e do cravo da Índia sobre a morfologia de espécies de *Candida* não-albicans, conseguiram esclarecer o mecanismo pelo qual esses óleos promovem a morte celular. A equipe registrou morte celular total na concentração de

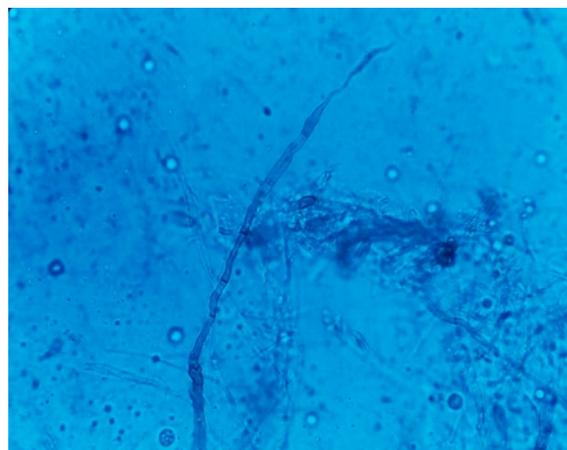
320 $\mu\text{L}/\text{mL}$, e confirmou o óleo de cravo da Índia como o de maior ação antimicrobiana. Por fim, foi registrada alteração nas estruturas, quando comparadas com os grupos controle, evidenciando raras leveduras com blastoconídios e raras pseudo-hifas. Tais resultados são convergentes com os apresentados nesta pesquisa, ainda que a espécie seja diferente também foram visualizadas estruturas danificadas quando em contato com o óleo utilizado.

Figura 16: Efeito do óleo fixo de licuri e essencial tomilho sobre a morfologia de *C. gloeosporioides* cultivado em caldo *Sabouraud* por 3 dias a 28°C, sob agitação orbital de 150 rpm. Ampliação de 800X. Micélio controle (A). Tratado com 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de emulsão de licuri e concentração do óleo 0,5% (B). 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de emulsão de tomilho e concentração do óleo 0,25% (C).

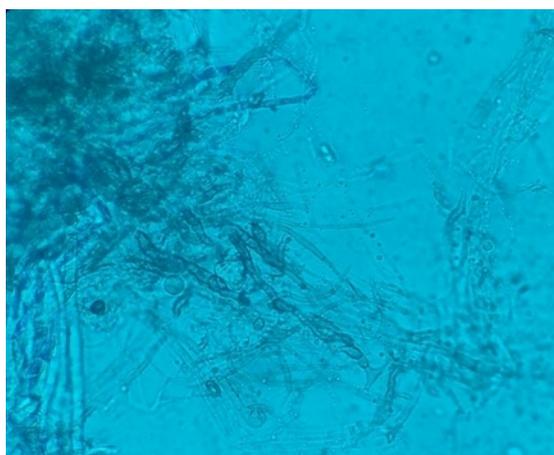
A



B



C



Fonte: Autoria própria.

Oliveira e colaboradores (2016) utilizando a mesma premissa desta pesquisa avaliou as alterações morfológicas no crescimento de espécies de candida a fim de compreender a ação do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*. A equipe constatou a eficácia do óleo em reduzir a presença de candida por aumentar a permeabilidade da membrana celular utilizando corantes e conseguiu registrar alterações nas estruturas das espécies analisadas quando tratadas com o óleo essencial. Resultados similares aos reportados nesta pesquisa.

6.6 Aplicação das coberturas no caju

6.6.1 Capacidade das coberturas de manter a massa dos caju

As massas dos caju foram verificadas diariamente durante as análises com o objetivo de elucidar se as coberturas desenvolvidas seriam capazes de promover a retenção da água no pedúnculo. O grupo *in natura* apresentou a maior perda de líquido, em média cada caju desse grupo possuía aproximadamente 130 g no início das análises e 120 g ao final das 48 horas, quando sua superfície já estava tomada pelo crescimento fúngico e a análise foi concluída.

Em relação aos grupos que permaneceram em análise por 48 horas, o grupo do controle negativo apresentou perda aproximada de 9 g; o grupo glicerol protetivo perdeu em média 3 g; o grupo glicerol curativo exsudou em média 7 g.

Em relação aos grupos que permaneceram em análise por 72 horas, o grupo do tomilho protetivo perdeu aproximadamente em média 12 g; o grupo do tomilho curativo perdeu em média 7 g; o grupo do licuri protetivo perdeu em média 9 g; o grupo do licuri curativo exsudar em média 8 g.

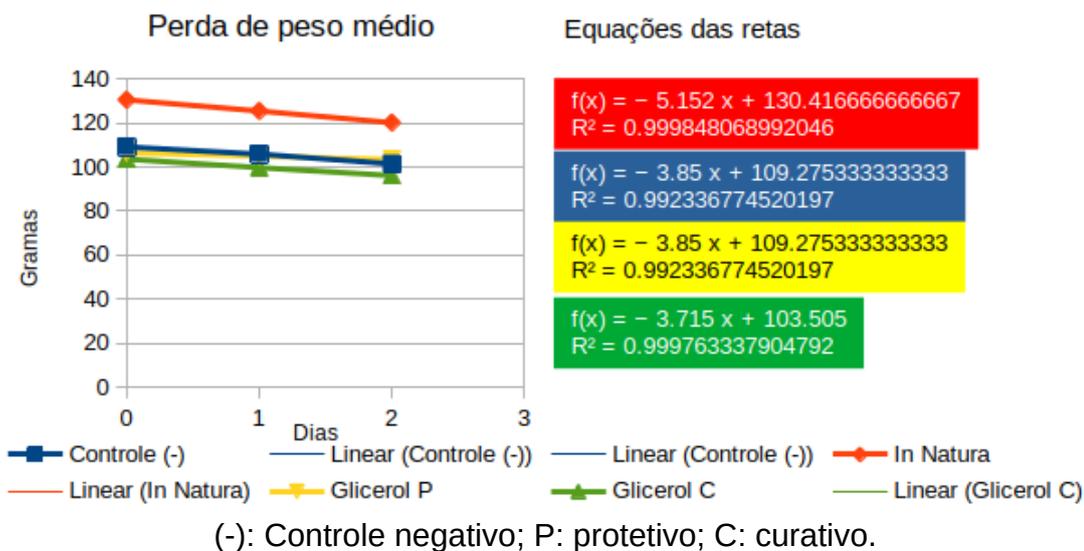
É possível observar na figura 17 os gráficos contendo as equações das retas de cada grupo. A partir dessas leituras é possível ratificar o grupo *in natura* como sendo o que possui o menor coeficiente angular e dessa forma o que perde massa com mais intensidade.

Em termos percentuais o método curativo foi mais eficiente em reter a massa dos caju, pois houve uma perda de -10.82% no grupo que recebeu óleo essencial de tomilho no método protetivo contra uma perda de -6.30% no método curativo. De

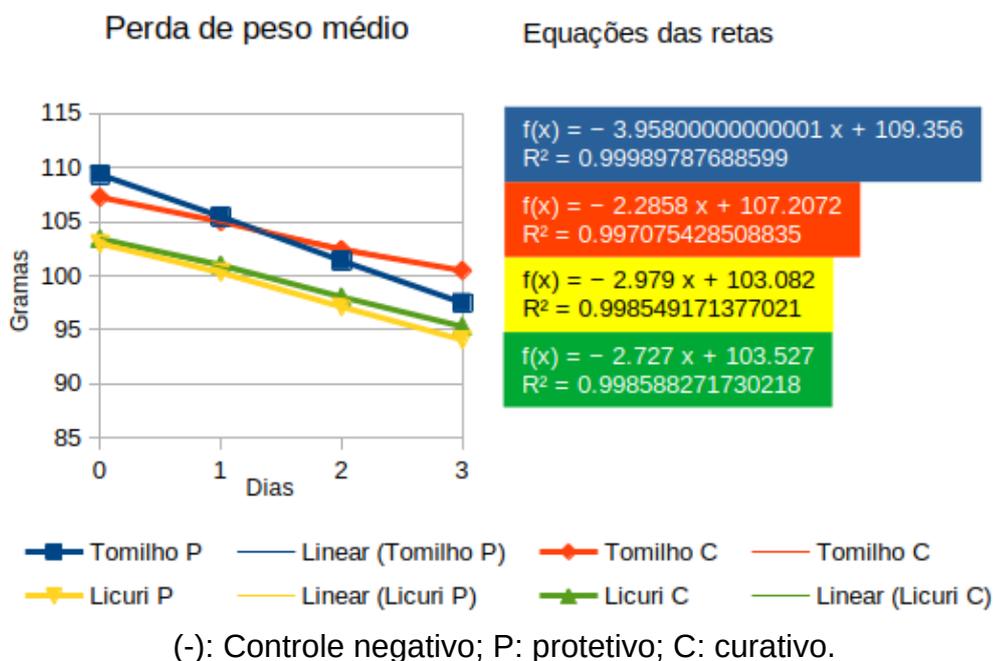
forma análoga, houve uma perda de -8.62% no grupo que recebeu o óleo fixo de licuri no método protetivo e uma perda percentual de -7.84% no método curativo.

Figura 17: Gráfico das perdas de massa sobre o tempo de análise. Grupos que não continham óleos vegetais (A). Grupos que continham óleos vegetais (B).

A



B



Fonte: Autoria própria.

Poucos trabalhos científicos visando a proteção dos pedúnculos de caju com coberturas comestíveis foram conduzidos até então, por exemplo o registro de Oliveira e Nunes (2011) ainda que antigo, pode encaminhar assertividade nesta pesquisa. A equipe ao avaliar a capacidade da quitosana extraída do caranguejo-uçá confirmou a concentração de quitosana a 1,5% como a que obteve maior aderência na superfície do caju e que quanto mais essa concentração for aumentada, mais fracamente aderida ficará a cobertura. Nesta pesquisa foi utilizada a concentração de 1% de quitosana de origem fúngica.

Pinheiro (2012) ao produzir e avaliar cobertura comestível, contendo 11% de cera de carnaúba, adicionada ou não de agentes antimicrobianos e aplicadas em cajus armazenados a 24°C verificou que, assim como esta pesquisa, que o tempo máximo de armazenamento encerra em 4 dias. Além disso, as perdas de massas estiveram próximas a -7%, resultados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa.

Sena e colaboradores (2019) ao testarem a influência de cobertura à base de amido (4%*m/v*) enriquecido ou não com cálcio nos pedúnculos de caju em manter o peso dos frutos durante estoque refrigerado (5°C) por 25 dias, confirmaram que a base amilácea não é a mais indicada para esse tratamento e não somente não conseguiu reter água como foi o grupo que mais a perdeu, comparado com o método de hidroresfriamento aplicado pela equipe. O grupo concluiu ainda que uma base preferencialmente coberturas contendo lipídios poderiam obter mais sucesso, tal como realizado nesta pesquisa.

Oliveira (2020) ao avaliar cobertura composta por hidroxipropilmetilcelulose e cera de abelha na preservação dos pedúnculos de caju armazenados a 21°C confirmaram a eficácia da adição de uma barreira hidrofóbica na manutenção da massa. Houve uma perda aproximada de -8% contra uma perda de 15% do grupo controle. A pesquisa indicou ainda que os cajus resistiram no máximo a 4 dias nessa temperatura, resultados similares aos descritos nesta pesquisa.

6.6.2 Ação das coberturas contra *C. gloeosporioides*

A capacidade das coberturas de retardarem o crescimento fúngico foi avaliada e registrada durante do período de 72 horas quando as hifas do *C. gloeosporioides* conseguiram cobrir toda a superfície dos cajus. Durante as primeiras 24 horas nenhum grupo apresentou crescimento fúngico visível. Porém, a partir de 48 horas pode-se observar, conforme figura 18, que o crescimento fúngico já era visível em aproximadamente 25% da superfície de um caju do grupo controle negativo.

Para o grupo *in natura*, todos os cinco cajus já apresentavam ao menos 25% de sua superfície coberta pelas partes visíveis do fungo ao final das 48 horas. Dado que o grupo *in natura* não passou pela etapa de infecção da solução contendo esporos de *C. gloeosporioides* e que a coloração do fungo é diferente, acredita-se que este crescimento seja de outra espécie.

Figura 18: Crescimento fúngico após 48 horas a 25°C. *In natura* (A). Controle negativo (B).

A



B



Fonte: Autoria própria.

O grupo que recebeu apenas o glicerol no modo curativo apresentou crescimento aproximado de 50% da superfície dos cajuís ao final das 48 horas. Enquanto que o grupo glicerol protetivo apresentou um crescimento na superfície mais discreto, conforme é possível comparar na figura 19.

Figura 19: Crescimento fúngico após 48 horas a 25°C. Glicerol (curativo) (A). Glicerol (preventivo) (B).

A



B

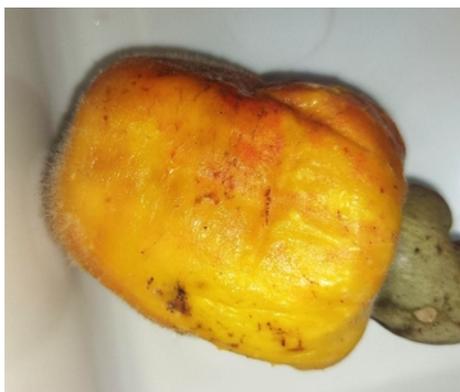


Fonte: Autoria própria.

O grupo que recebeu a cobertura com óleo fixo de licuri no modo curativo apresentou menor crescimento fúngico, após 48 horas, por volta de 10% da superfície. Resultados similares aos dos grupos que receberam a cobertura com óleo fixo de licuri no modo protetivo, cobertura de tomilho no modo protetivo e curativo, conforme foi registrado pela figura 20. Até onde pode-se verificar a capacidade antifúngica do óleo fixo de licuri contra *C. gloeosporioides* não foi objeto de pesquisas anteriores.

Figura 20: Crescimento fúngico após 48 horas a 25°C. Cobertura de óleo fixo de licuri (curativo) (A). Cobertura de óleo fixo de licuri (protetivo) (B). Cobertura de óleo essencial de tomilho (curativo) (C). Cobertura de óleo essencial de tomilho (curativo) (D).

A



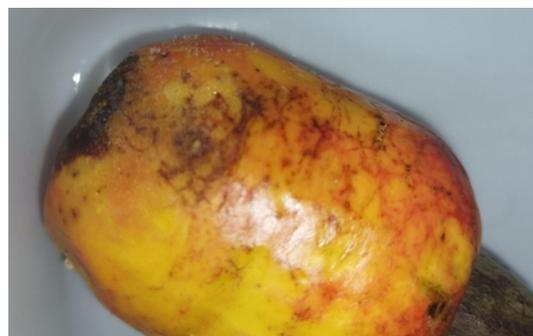
B



C



D



Fonte: Autoria própria.

Ao final das 72 horas os grupos que não receberam tratamento com algum óleo já apresentavam toda a superfície tomada pelo crescimento fúngico, conforme figura 21.

Figura 21: Crescimento fúngico após 72 horas a 25°C. *In natura* (A). Controle negativo (B). Glicerol (curativo) (C). Glicerol (preventivo) (D).

A



B



C



D



Fonte: Autoria própria.

Contudo, os grupos cujos tratamentos receberam algum óleo ainda mantiveram resistência ao crescimento fúngico após 72 horas, conforme atestado na figura 22.

Figura 22: Crescimento fúngico após 72 horas a 25°C. Cobertura de óleo fixo de licuri (curativo) (A). Cobertura de óleo fixo de licuri (protetivo) (B). Cobertura de óleo essencial de tomilho (curativo) (C). Cobertura de óleo essencial de tomilho (curativo) (D).

A



B



C



D



Fonte: Autoria própria.

Ao fim das 96 horas de armazenamento todos os grupos tiveram suas superfícies cobertas pelas partes visíveis do fungo, conforme figura 23. Visualmente a cobertura que continha o óleo essencial de tomilho apresentou resultados ligeiramente melhores em retardar o crescimento fúngico. O método protetivo mostrou-se visualmente mais eficaz tanto para a cobertura com óleo essencial de tomilho quanto para cobertura com óleo fixo de licuri.

Foi possível assegurar que o crescimento fúngico foi retardado, sendo necessário que o fungo precisasse do dobro do tempo para cobrir a superfície dos pedúnculos que receberam tratamento com algum dos óleos analisados, quando comparado ao tempo que o fungo cobriu os grupos que não receberam algum dos óleos na composição de sua cobertura.

Vilaplana, Pazmiño e Chamorro (2018) averiguaram a ação do óleo essencial de tomilho no controle da antracnose desenvolvido por *Colletotrichum musae* em bananas orgânicas. A equipe conseguiu constatar ação fungicida desse óleo na concentração de 0,5%, sendo inclusive essa dose mais eficaz do que o fungicida sintético, imazalil, usado como controle. De forma transversal pode-se comparar as duas pesquisas, haja vista que, mesmo não sendo da mesma espécie, os fungos são do mesmo gênero. Embora o *C. musae* tenha apresentado maior sensibilidade ao óleo essencial de tomilho, a composição do óleo usado pela equipe apresentava timol, carvacrol e p-cimeno como principais componentes, enquanto que o óleo essencial de tomilho usado nesta pesquisa apresentava timol, p-cimeno e γ -terpineno.

Pacheco e colaboradores (2017) ao emulsionarem, até atingirem o tamanho de nanopartículas, quitosana com óleo essencial de tomilho (5%v/v) conseguiram comprovar sua ação protetiva tanto contra os esporos do *C. gloeosporioides in vitro*, assim como constataram a ação sinérgica da quitosana com este óleo na proteção de abacates infectados pelo fungo. A incidência do desenvolvimento da antracnose e a severidade foram reduzidos quase pela metade. Resultados correlatos aos registrados nesta pesquisa onde o tempo necessário para o desenvolvimento fúngico em toda superfície do caju foi também estendido.

Figura 23: Crescimento fúngico após 96 horas a 25°C. Cobertura de óleo fixo de licuri (curativo) (A). Cobertura de óleo fixo de licuri (protetivo) (B). Cobertura de óleo essencial de tomilho (curativo) (C). Cobertura de óleo essencial de tomilho (curativo) (D).

A



B



C



D



Fonte: Autoria própria.

7 CONCLUSÕES

- As emulsões de quitosana-óleo essencial de tomilho/óleo fixo de licuri apresentaram estabilidade.
- A emulsão quitosana-óleo fixo de licuri obteve o estado de nanoemulsão enquanto que a emulsão quitosana-óleo essencial de tomilho de microemulsão.
- Ambas as coberturas apresentaram ação antimicrobiana para as bactérias e fungos testados e foram classificadas como não irritantes.
- O método curativo mostrou-se mais eficaz na manutenção da massa dos cajus, enquanto que o método protetivo mostrou-se mais eficaz em retardar o crescimento fúngico.
- A cobertura composta por óleo essencial de tomilho apresentou teor de compostos fenólicos totais mais de cinco vezes superior à emulsão composta por óleo fixo de licuri.
- A emulsão de tomilho altera a morfologia do *C. gloeosporioides* de forma mais intensa e em menor concentração.
- Ambas as coberturas foram responsáveis pelo aumento do tempo em que o fungo analisado é capaz de cobrir a superfície do caju.

REFERÊNCIAS

- AAYUSH, K. et al. Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed Apple. **Food Control**. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109188>
- ABBADE, E. Estimating the potential for nutrition and energy production derived from maize (*Zea mays* L.) and rice (*Oryza sativa* L.) losses in Brazil. **Waste Management**. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.08.009>
- ABRELPE. Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil 2020. Acesso em 10/01/2023. Disponível em: <https://abrelpe.org.br/panorama/>.
- ADAIR, P. et al. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of xyloglucan-chitosan film from tamarind (*tamarind indica* L.) seed kernel. **Progress in Organic Coatings**. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2023.107486>
- AL-MOGHAZY, M. et al. Edible packaging coating of encapsulated thyme essential oil in liposomal chitosan emulsions to improve the shelf life of Karish cheese. **Food Bioscience**. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101230>
- ALI, S. et al. Biowastes for biodegradable bioplastics production and end-of-life scenarios in circular bioeconomy and biorefinery concept. **Bioresource Technology**. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127869>
- ALVES, A. et al. Revestimentos comestíveis à base de polissacarídeos em frutas: uma revisão narrativa. in: Verruck, S. (Org.). *Avanços em ciência e tecnologia de alimentos*. v, 6. 2022. DOI: 10.37885/978-65-5360-090-4
- ANASTAS P.T., WARNER J.C. *Green chemistry: theory and practice*. Oxford University Press. 1998.
- ARMENISE, S et al. Plastic waste recycling via pyrolysis: A bibliometric survey and literature review. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2021.105265>
- BALCI, E. TUNA, O. Investigating logistics-related food loss drivers: A study on fresh fruit and vegetable supply chain. **Journal of Cleaner Production**. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128561>
- BANDARA, R., INDUNIL, G. Food packaging from recycled papers: chemical, physical, optical properties and heavy metal migration. **Heliyon**. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10959>

BASTOS, S. Formulação De Enxaguatório Bucal Contendo Emulsões A Base De Óleo Fixo De Syagrus Coronata (Licuri): Caracterização, Avaliação Antimicrobiana, Toxicidade E Het-Cam. 2017. Tese de doutorado. Pós Graduação em Ciências Biológicas - UFPE. Recife, 28 / 11 / 2017.

BAŞYIĞIT, B. et al. Microencapsulation of sour cherry oil by spray drying: Evaluation of physical morphology, thermal properties, storage stability, and antimicrobial activity. **Powder Technology**. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2020.02.035>

BELVISO, S. et al. Phenolic composition, antioxidant capacity and volatile compounds of licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari) fruits as affected by the traditional roasting process. **Food Research International**. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.012>

BERGER, L. et al. Chitosan produced from Mucorales fungi using agroindustrial by-products and its efficacy to inhibit *Colletotrichum* species. **INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES**. 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.178

BESSA, C. et al. *Syagrus coronata* seed oils have antimicrobial action against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of medicinal plants research**. 2016. <https://doi.org/10.5897/JMPR2016.6098>

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 216, DE 15 DE SETEMBRO DE 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução De Diretoria Colegiada - RDC Nº 91, de 11 de Maio de 2001.

Brasil. Ministério da Saúde. RDC Nº 26. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. 2014.

Brasil. Ministério da Saúde. RDC Nº 725. Dispõe sobre os aditivos alimentares aromatizantes. 2022.

CAI, C. et al. Effect of starch film containing thyme essential oil microcapsules on physicochemical activity of mango. **LWT - Food Science and Technology**. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109700>

CASCUDO, L. C. Antologia da Alimentação no Brasil. Global Editora. 1 edição Digital. 2014.

CASCUDO, L. C. História da Alimentação no Brasil. Global Editora. 1 edição Digital. 2016.

CHAKRAVARTY, J. EDWARDS, T. Innovation from waste with biomass-derived chitin and chitosan as green and sustainable polymer: A review. **Energy Nexus**. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100149>

CHELLIAH, R. et al. Unravelling the sanitization potential of slightly acidic electrolyzed water combined Thymus vulgaris based nanoemulsion against foodborne pathogens and its safety assessment. **Food Control**. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109527>

COIMBRA, A. et al. 2022. Antimicrobial activity of Thymus zygis essential oil against Listeria monocytogenes and its application as food preservative. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103077>

CORRÊA, A. et al. Lime and orange essential oils and d-limonene as a potential COVID-19 inhibitor: Computational, in chemico, and cytotoxicity analysis. **Food Bioscience**. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102348>

DU, T. et al. Phytochemicals-based edible coating for photodynamic preservation of fresh-cut apples. **Food Research International**. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112293>

EMBRAPA - Documento 199. Licuri Syagrus Coronata (Mart.) Becc / Marcos Antônio Drumond. 2007.

EMBRAPA. Produção de castanha do caju cresce 33% em 2022. Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação. 26/01/23. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/78004497/producao-de-castanha-do-caju-cresce-33-em-2022>. Acesso em: 24/06/2023.

FACCHINI, F. et al. Agri-food loss and waste management: Win-win strategies for edible discarded fruits and vegetables sustainable reuse. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103235>

FAUSTINO, E. et al. Uso de revestimento à base de amido de mandioca e quitosana na conservação de passas de caju. **Brazilian Journal of Development**. 2021. DOI:10.34117/bjdv7n12-678

FERNANDES et al. Composição da comunidade de fungos filamentosos de ambiente aéreo urbano de Santarém, Pará. In: BIOTECNOLOGIA MICROBIANA - VOLUME 1: org.: Silva, S. 2023. DOI 10.37885/230111839.

FIRDUOS, N. et al. Advances in formulation, functionality, and application of edible coatings on fresh produce and fresh-cut products: A review. **Food Chemistry**. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135186>

Food and Agriculture Organization. The State of Food and Agriculture 2019. Moving forward on food loss and waste reduction. 2019. Disponível em: <https://www.fao.org/3/ca6030en/ca6030en.pdf>. Acesso em: 15/01/2023.

GHARANJIG, H. et al. Development and optimization of complex coacervates based on zedo gum, cress seed gum and gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2020.

GHAVAN, M. GC-MS analysis and antimicrobial activities of a *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from Kashan Region (Iran). **Biochemical Systematics and Ecology**. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2022.104507>

Ghoshal, G. Thakur, S. Thyme essential oil nano-emulsion/Tamarind starch/Whey protein concentrate novel edible films for tomato packaging. **Food Control**. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108990>

GOODARZI, R. et al Effect of thymol on antimicrobial susceptibility, and adhesion genes expression of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from pediatric urinary tract infection. **Journal of Pediatric Urology**. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2023.07.001>

GUDIÑA, E. J.; et al. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. **Letters in applied microbiology**. 2010.

HASSAN, B. et al. Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.097>

HOA, V. et al. Coating with chitosan containing lauric acid (C12:0) significantly extends the shelf-life of aerobically – Packaged beef steaks during refrigerated storage. **Meat Science**. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108696>

JAOUADI, R., BOUSSAID, M., ZAOUALIVARIATION, Y. in essential oil composition within and among Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss et Reut. (Lamiaceae) populations: Effect of ecological factors and incidence on antiacetylcholinesterase and antioxidant activities. **Biochemical Systematics and Ecology**. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2022.104543>

JURIĆ, S et al. Chitosan-based layer-by-layer edible coatings application for the preservation of mandarin fruit bioactive compounds and organic acids. **Food Chemistry: X**. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100575>

KHALDI, S. NAOUARI, M. JEMAA, A. Cardoon (*Cynara cardunculus* L.) oil from cultivated and wild Tunisian populations and its antimicrobial activity. **Industrial Crops and Products**. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113852>

KIANE, R., ARZANI, A., MAIBODY, S. Polyphenols, flavonoids and antioxidant activity involved in salt tolerance in wheat, *Aegilops cylindrica* and their amphidiploids. **Front. Plant Sci.** 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.646221>

KUMAR, P. Fatty Acids as Antibiofilm and Antivirulence Agents. **Cell Press.** 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.014>

LEAL, L. et al. Determination of the critical hydrophile-lipophile balance of licuri oil from *Syagrus coronata*: application for topical emulsions and evaluation of its hydrating function. **Braz. J. Pharm. Sci.** 2013. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502013000100018>

LEE et al. Recent advances and challenges in the biotechnological upcycling of plastic wastes for constructing a circular bioeconomy. **Chemical Engineering Journal.** 2023. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.14047>

LEYVA-JÍMENEZ, F. et al. Comprehensive review of natural based hydrogels as an upcoming trend for food packing. **Food Hydrocolloids.** 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108124>

LI et al. Applications of natural polysaccharide-based pH-sensitive films in food packaging: Current research and future trends. **Innovative Food Science & Emerging Technologies.** 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103200>

LIMA, A. et al. Evaluation of freeze-dried phenolic extract from cashew apple by-product: Physical properties, in vitro gastric digestion and chemometric analysis of the powders. **Food Chemistry: Molecular Sciences.** 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100149>

LIMA, G. et al. Chitosan as an antimicrobial agent to increase shelf life of foods. In: Savvaidis, I. (Org.) Chitosan: Novel Applications in Food Systems. 2023. <https://doi.org/10.1016/C2019-0-03996-9>

LISBOA, M. et al. Oleochemistry potential from Brazil northeastern exotic plants. **Biochimie.** 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.09.002>

LUEPKE, N. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology.** 1985. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(85\)90030-4](https://doi.org/10.1016/0278-6915(85)90030-4)

MASIERO, J. et al. Vegetable oils in pharmaceutical and cosmetic lipid-based nanocarriers preparations. **Industrial Crops and Products.** 2021. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113838>

MATZEMBACHER, D. VIEIRA, L . BARCELLOS, M. An analysis of multi-stakeholder initiatives to reduce food loss and waste in an emerging country – Brazil. **Industrial Marketing Management.** 2021. <https://doi.org/10.1016/j.indmarman.2020.08.016>

MCGEE, H. Comida & cozinha: Ciência e cultura da culinária. 2 ed. São Paulo. ed. WMF Martins Fontes. 2014.

MELO, N. et al. Effects of fungal chitosan nanoparticles as eco-friendly edible coatings on the quality of postharvest table grapes. **Postharvest Biology and Technology**. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.01.014>

MIRSHARIFI, S. et al. Production, characterization, and antimicrobial activity of almond gum/polyvinyl alcohol/chitosan composite films containing thyme essential oil nanoemulsion for extending the shelf-life of chicken breast fillets. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.183>

MORADI, S. E BARATI, A. Essential Oils Nanoemulsions: Preparation, Characterization and Study of Antibacterial Activity against Escherichia Coli. **Int. J. Nanosci. Nanotechnol.** 2019.

MOUZAHIM, M. et al. Food packaging composite film based on chitosan, natural kaolinite clay, and Ficus. carica leaves extract for fresh-cut apple slices preservation. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123430>

MUKURUMBIRA, A. et al. The antimicrobial efficacy of native Australian essential oils in liquid and vapour phase against foodborne pathogens and spoilage microorganisms. **Food Control**. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109774>

MURMU, S., MISHRA, H. Post-harvest shelf-life of banana and guava: Mechanisms of common degradation problems and emerging counteracting strategies. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.07.011>

NASCIMENTO et al. Chitosan–citric acid edible coating to control Colletotrichum gloeosporioides and maintain quality parameters of fresh-cut guava. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.067>

NARAYANA, S., et al. Potential benefits of using chitosan and silk fibroin topical hydrogel for managing wound healing and coagulation. **Saudi Pharmaceutical Journal**. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2023.01.013>

OLIVEIRA, B. NUNES, M. Avaliação de quitosana de caranguejo-uçá (Ucides cordatus) como biofilme protetor em caju. **SCIENTIA PLENA**. v 7. n. 4. 2011.

OLIVEIRA, K. Recobrimento Comestível A Base De Hidroxipropilmetilcelulose E Cera De Abelha Na Conservação Pós-Colheita De Caju. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Jaboticabal. p. 66. 2020.

OLIVEIRA, L. et al. Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. **Rev. bras. plantas med.** 2016. https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_222

OLIVEIRA, N. et al. Cashew nut and cashew apple: a scientific and technological monitoring worldwide review. **Journal of Food Science and Technology**. 2019. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04051-7>

ONUa. Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. 2015. Disponível em:

<https://documents-dds-ny.un.org/doc/UNDOC/GEN/N15/291/89/PDF/N1529189.pdf?OpenElement>. Acesso em: 04/01/2023

ONUb. Department of Economic and Social Affairs. Sustainable development. The 17 Goals. 2015. Disponível em: <https://sdgs.un.org/goals>. Acesso em: 04/01/2023

OUN, A. et al. Comparative study of oregano essential oil encapsulated in halloysite nanotubes and diatomaceous earth as antimicrobial and antioxidant composites. **Applied Clay Science**. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2022.106522>

Pacheco, Z. et al. The Effect of Nanostructured Chitosan and Chitosan-thyme Essential Oil Coatings on *Colletotrichum gloeosporioides* Growth in vitro and on cv Hass Avocado and Fruit Quality. **Journal of phytopathology**. 2017. <https://doi.org/10.1111/jph.12562>

PARICHANON, P. et al. Antimicrobial activity of lime oil in the vapour phase against *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat salad during cold storage and its possible mode of action. **Food Control**. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108486>

PATEIRO, M. et al. Application of essential oils as antimicrobial agents against spoilage and pathogenic microorganisms in meat products. **International Journal of Food Microbiology**. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108966>

PIÑERO, M. et al. Effect of heating temperature of a novel wheat-derived surfactant on a mixture of thyme essential oil/surfactant and on the final emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123649>

PINHEIRO, N. Revestimentos Com Cera De Carnaúba Incorporados De Antimicrobianos Em Caju (*Anacardium occidentale* L) E Goiaba (*Psidium guajava*). Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. p. 112. 2012.

QASIN, et al. Renewable cellulosic nanocomposites for food packaging to avoid fossil fuel plastic pollution: a review. **Environmental Chemistry Letters**. 2021. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01090-x>

RANJBAR, A. et al. Antifungal activity of thymol against the main fungi causing pomegranate fruit rot by suppressing the activity of cell wall degrading enzymes. **LWT**. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113303>

REINA, L. et al. Chemical composition and bioactive compounds of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and bagasse from Colombian varieties. **Heliyon**. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09528>

RIDDELL, R. Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. **Mycologia**. 1950. <https://doi.org/10.1080/00275514.1950.12017830>

ROSA, R. et al. Principles and indicators for assessing the environmental dimension of sustainability within green and sustainable chemistry. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2022.100654>

RUTZ, J. K. et al. Microencapsulation of palm oil by complex coacervation for application in food systems. **Food Chemistry**. 2017.

RUX, G. et al. Investigation on the potential of applying bio-based edible coatings for horticultural products exemplified with cucumbers. **Current Research in Food Science**. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.100407>

SALEHI, B. et al., *Thymus* spp. plants - Food applications and phytopharmacy properties. **Trends in Food Science & Technology**. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.01.020>

SANTOS, C. et al. Atividade antifúngica de isolados clínicos de *Candida* não-albicans aos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) e *Eucalyptus globulus* (eucalipto-comum). **Medicina** (Ribeirão Preto). 2021. DOI: 10.11606/issn.2176-7262.rmrp.2021.168684.

SANTOS, E. SILVA, A. RIBEIRO, E. Como a biotecnologia exerce influência sobre o ambientalismo diante de uma sociedade pautada pelo consumismo? In: Souza, E. (org.) **Pesquisas em temas multidisciplinares**. v.4. 2022. DOI: 10.46898/rfb.9786558892526.8

SANTOS, L. et al. Fatty acid-rich volatile oil from *Syagrus coronata* seeds has larvicidal and oviposition-deterrent activities against *Aedes aegypti*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.05.008>

- SANTOS, S. et al. Seasonal and geographical variation in the chemical composition of essential oil from *Allophylus edulis* leaves. **South African Journal of Botany**. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.12.013>
- SARAVANAN, A. et al. review on extraction of polysaccharides from crustacean wastes and their environmental applications. **Environmental Research**. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115306>
- SARKAR, A. et al. Transesterification, GC-MS profiling, and in vitro antimicrobial potential of oil obtained from seeds of *Citrus maxima* (Burm.) **Merr. Industrial Crops and Products**. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115764>
- Sarkhosh, A. et al. Antifungal activity of five plant-extracted essential oils against anthracnose in papaya fruit. **Biological Agriculture & Horticulture**. 2017a. <http://dx.doi.org/10.1080/01448765.2017.1358667>
- Sarkhosh, A. et al. Antifungal activity of five plant-extracted essential oils against anthracnose in papaya fruit. **Food Packaging and Shelf Life**. 2017b. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.02.001>
- SENA, E. et al. Calcium application via hydrocooling and edible coating for the conservation and quality of cashew apples. **Scientia Horticulturae**. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.05.058>
- SENA, E. et al. Postharvest quality of cashew apple after hydrocooling and cold room. **Postharvest Biology and Technology**. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.05.002>
- SHEN, C. et al. Topical advances of edible coating based on the nanoemulsions encapsulated with plant essential oils for foodborne pathogen control. **Food Control**. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109419>
- SILUÉ, Y. et al. Hexanal application reduces postharvest losses of mango (*Mangifera indica* L. variety "Kent") over cold storage whilst maintaining fruit quality. **Postharvest Biology and Technology**. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.111930>
- SILVA, A., et al. The evidence of health benefits and food applications of *Thymus vulgaris* L. **Trends in Food Science & Technology**. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.010>
- SIM, J. et al. Antimicrobial activity of thyme oil, oregano oil, thymol and carvacrol against sensitive and resistant microbial isolates from dogs with otitis externa. **Veterinary Dermatology**. 2019. <https://doi.org/10.1111/vde.12794>

Singleton, V., Rossi, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**. 1965.

SOLEIMANI, M. et al. Phenolic compounds and antimicrobial properties of mint and thyme. **Journal of Herbal Medicine**. 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.hermed.2022.100604>

SOUZA, J. A QUÍMICA DO LICURI: DO SEMIÁRIDO PARA A SALA DE AULA. Trabalho de conclusão de curso. Licenciatura em Química. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Amargosa. p. 72. 2018.

SOUZA, T. et al. Biological safety of *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. Fixed oil: Cytotoxicity, acute oral toxicity, and genotoxicity studies. **Journal of Ethnopharmacology**. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113941>

SOUZA, A. VIEIRA, G. NEVES, L. Uso de óleos essenciais no controle do *Colletotrichum gloeosporioides* causador da antracnose no caju. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**. 2019. DOI: 10.18677/EnciBio_2019A132

STAMFORD, T. C. M.; et al. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic Journal of Biotechnology**. 2007.

SUCUPIRA, E. et al. Evaluation of cooking methods on the bioactive compounds of cashew apple fiber and its application in plant-based foods. **Heliyon**. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05346>

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA). Universidade de São Paulo (USP). Food Research Center (FoRC). Versão 7.2. São Paulo, 2023. [Acesso em: 16/03/2023]. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tbca>.

TAN, Q. et al. Is reusable packaging an environmentally friendly alternative to the single-use plastic bag? A case study of express delivery packaging in China. **Resources, Conservation and Recycling**. 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2022.106863>

TAO, R. SEDMAN, J. ISMAIL, A. Antimicrobial activity of various essential oils and their application in active packaging of frozen vegetable products. **Food Chemistry**. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129956>

VELOSO, J. et al. Antracnose do cajueiro: etiologia, sintomatologia e aspectos epidemiológicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. 2022. doi: 10.31976/0104-038321v280009

VELOSO, J et al. Why species delimitation matters for fungal ecology: Colletotrichum diversity on wild and cultivated cashew in Brazil. **Fungal Biology**. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.03.005>

Vilaplana, Pazmiño e Chamorro. Control of anthracnose, caused by Colletotrichum musae, on postharvest organic banana by thyme oil. **Postharvest Biology and Technology**. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.12.008>

WATERHOUSE, A. Determination of Total Phenolics. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. 2003. <https://doi.org/10.1002/0471142913.fai0101s06>

WHITEKER, G. Applications of the 12 Principles of Green Chemistry in the Crop Protection Industry. **Organic Process Research & Development**. 2019. doi:10.1021/acs.oprd.9b00305

YADAV, L. et al. Chitosan-based 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.215>

YADAV, M. et al. Seafood waste: a source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials. **Bioresources and Bioprocessing**. DOI: 10.1186/s40643-019-0243-y

YILAN, G. CORDELLA, M. MORONE, P. Evaluating and managing the sustainability of investments in green and sustainable chemistry: An overview of sustainable finance approaches and tools. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2022.100635>

ZHANG, Y. et al. Preparation and characterization of curdlan/polyvinyl alcohol/ thyme essential oil blending film and its application to chilled meat preservation. **Carbohydrate Polymers**. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116670>

ZHANG, et al. Freezing enhances the killing of S. aureus by thymol via a unique bactericidal mechanism in cold chain food. **Food Control**. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109936>

ZHAO, J. LAN, W. XIE, J. Recent developments in nanoemulsions against spoilage in cold-stored fish: A review. **Food Chemistry**. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136876>

ANEXO A - 12 princípios da Química Verde por Anastas e Warner (1998)

1. Prevenção de rejeito. Desenvolvimento de sínteses químicas para a prevenção de rejeitos. Não produza rejeitos para tratar ou limpar.
2. Maximize a eficiência atômica. Projete sínteses de modo que o produto final contenha a proporção máxima dos materiais iniciais. Desperdice poucos ou nenhum átomo.
3. Projetar sínteses químicas menos perigosas: Projetar sínteses para usar e gerar substâncias com pouca ou nenhuma toxicidade para humanos ou meio ambiente.
4. Projetar produtos químicos e produtos mais seguros: Projetar produtos químicos totalmente eficazes, mas com pouca ou nenhuma toxicidade.
5. Use solventes e condições de reação mais seguros: Evite usar solventes, agentes de separação ou outros produtos químicos auxiliares. Se você precisar usar esses produtos químicos, use os mais seguros.
6. Aumente a eficiência energética: Execute reações químicas em temperatura e pressão ambiente sempre que possível.
7. Use matérias-primas renováveis em vez de esgotáveis.
8. Evite derivatizantes químicos: Evite usar grupos bloqueadores e protetores ou quaisquer modificações temporárias, se possível. Os derivatizantes usam reagentes adicionais e geram resíduos.
9. Use catalisadores, não reagentes estequiométricos: Minimize o desperdício usando reações catalíticas. Os catalisadores são eficazes em pequenas quantidades e podem realizar uma única reação várias vezes. Eles são preferíveis aos reagentes estequiométricos, que são usados em excesso e realizam uma reação apenas uma vez.
10. Projetar produtos químicos e produtos para degradar após o uso: Desenvolva produtos químicos para se decompor em substâncias inócuas após o uso, para que não se acumulem no meio ambiente.
11. Análise em tempo real para prevenir a poluição: Inclua monitoramento e controle em tempo real durante as sínteses para minimizar ou eliminar a formação de subprodutos.
12. Minimize o potencial de acidentes: Projete produtos químicos e suas formas físicas (sólidas, líquidas ou gasosas) para minimizar o potencial de acidentes químicos, incluindo explosões, incêndios e liberações no meio ambiente.

ANEXO B - Grupo de Trabalho Agenda 2030

Objetivos de Desenvolvimento Sustentável



Fonte: Grupo de Trabalho da Sociedade Civil

ANEXO C - Análise cromatográfica do óleo essencial de tomilho performada pela UFMG a pedido da AMANTIKIR



Universidade Federal de Minas Gerais
 Instituto de Ciências Exatas
 Departamento de Química/Colegiado de Extensão
 Telefax: (31) 3409-5720 – e-mail:nucleo.servicos@qui.ufmg.br

CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

Solicitante: **AMANTIKIR ORIGEM NATURAL EIRELI**

CNPJ: 28.495.005/0001-39

ÓLEO ESSENCIAL de Tomilho

Nome comercial: Óleo Essencial de Tomilho

Nomenclatura botânica: *Thymus vulgaris*

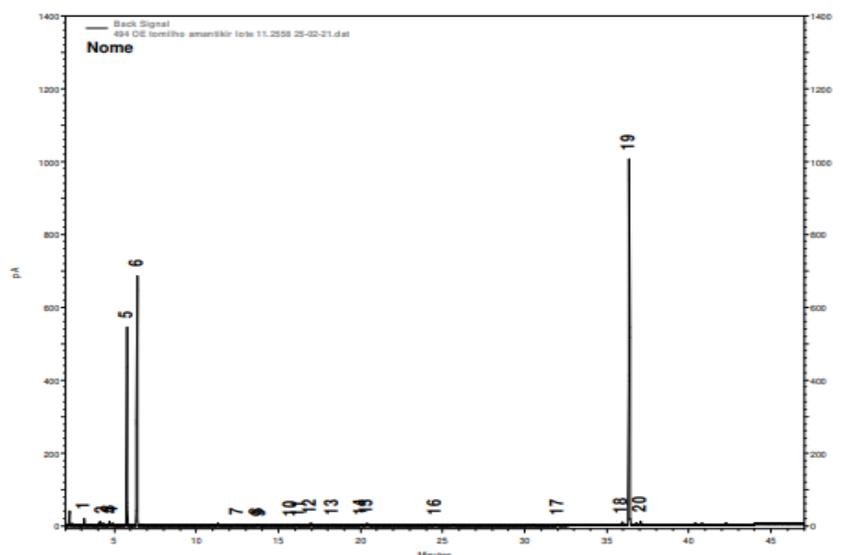
Extração: Arraste a vapor

Parte da planta: Partes aéreas

Lote: 11.2558

Composição Química

Pico	IR _{calc}	Composto	Área %
1	1162	β-mirceno	0,3
2	1196	α-terpineno	0,1
3	1206	limoneno	0,2
4	1211	eucaliptol	0,2
5	1238	γ-terpineno	18,6
6	1256	p-cimeno	25,4
7	1433	óxido linalila	0,1
8	1469	1-octen-3-ol	0,1
9	1473	trans-sabineno hidrato	0,1
10	1528	cânfora	0,1
11	1543	Isopinocanfona	0,1
12	1564	linalool	0,2
13	1603	trans-dihidrocarvona	0,1
14	1654	γ-elemeno	0,1
15	1663	α-humuleno	0,2
16	1785	E-α-Bisaboleno	0,1
17	2002	óxido de cariofileno	0,1
18	2116	espatulenol	0,3
19	2128	timol	49,4
20	2148	carvacrol	0,4
		outros	3,8



Mirra Angelina Neres da Silva
 Mirra Angelina Neres da Silva
 Química UFMG/DQ
 labcrom25dq@qui.ufmg.br
 mirrajolie@yahoo.com.br
 Belo Horizonte, 28 de junho
 de 2021.

Método de análise:

Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. Cromatógrafo a Gás AGILENT 7820A. ECTMwax-10
 30m x 0,32mm x 0,25 μm (Alltech). Temp.: Coluna: 50°C (5 min), 3 °C /min a 200°C. Injetor:
 200°C Split: 1/50. Detec tor FID:220°C. Vol. de injeção: 1 ul. 2,0% m/v em acetato de etila.