

## Revestimento comestível contendo carvacrol para conservação microbiológica de tomate no período de pós-colheita

### Edible coating containing carvacrol for postharvest microbiological conservation of tomato

#### RESUMO

O tomate é cultivado em vários países e tem uma participação significativa na produção mundial de alimentos. Essa cultura sofre uma enorme perda no período pós-colheita devido à doença fúngica. Para melhorar a conservação microbiológica de tomates em pós-colheita, o objetivo do trabalho foi investigar a atividade antifúngica do revestimento comestível à base de amido de mandioca / gelatina contendo carvacrol contra *A. alternata*. Carvacrol mostrou efeito inibitório (CIM = 0,30 g de carvacrol por grama de solução de revestimento) e revestimento comestível incorporado com 0,30 g de carvacrol por grama de solução de revestimento foi o mais efetivo em inibir o crescimento de *A. alternata in vivo* considerando também uma possível resposta sensorial. Estes resultados sugerem que a aplicação de revestimento comestível contendo carvacrol pode ser utilizado como alternativa para a redução da deterioração microbiológica de tomate no período pós-colheita.

**PALAVRAS-CHAVE:** Revestimento antimicrobiano. Carvacrol. Pós-colheita. Tomate uva.

**Cláudia Moreira Santa Catharina**  
[claudiac@alunos.utfpr.edu.br](mailto:claudiac@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.

**Felipe Guilherme Brunetto Bretschneider**  
[felipebretschneider@gmail.com](mailto:felipebretschneider@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.

**Bianca Piva**  
[bianca.piva2011@gmail.com](mailto:bianca.piva2011@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.

**Cleusa Ines Weber**  
[cleusaines@utfpr.edu.br](mailto:cleusaines@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.

**Ana Paula Romio**  
[anaromio@utfpr.edu.br](mailto:anaromio@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.

**Alessandra Machado-Lunkes**  
[amachado@utfpr.edu.br](mailto:amachado@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.

**Recebido:** 19 ago. 2019.

**Aprovado:**

**Direito autorial:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



#### ABSTRACT

Tomato is cultivated in several countries and has a significant participation in world food production. This culture suffers a huge loss in the postharvest period due to fungal disease. To improve the microbiological preservation of tomatoes in postharvest, the aim of work was investigated the antifungal activity of cassava starch/gelatin-based edible coating containing carvacrol against *A. alternata*. Carvacrol showed fungal inhibitory effect (MIC = 0.30 g of carvacrol per gram of coating solution) and edible coating incorporated with 0.30 g of carvacrol per gram of coating solution was the most effective in inhibiting the growth of *A. alternata in vivo* analysis, also considering a possible sensory response. These results suggest that the application of edible coating containing carvacrol could be used as alternative for the reduction of microbiological deterioration of tomato in the postharvest period.

**KEYWORDS:** Antimicrobial coating. Carvacrol. Postharvest. Grape tomato.

#### INTRODUÇÃO

O tomate requer grande quantidade de nutrientes para se desenvolver e os riscos de perda de produção em período de pós-colheita são altos. No Brasil há

registros de perda de 40% da produção de tomate e a contaminação por fungos é uma das principais causas (MORETTI et al., 2012). A perda de tomate ocorre principalmente no período de pós-colheita, como em outros frutos e vegetais (ALVARENGA, 2013). O tomate é suscetível a doenças pós-colheita causadas principalmente pelos fungos *Alternaria alternata* e *Botrytis cinerea* especificamente, *A. alternata* causa a mancha preta comumente na região peduncular do fruto (AHMED; SIPES; ALVAREZ, 2017).

A perda de tomate pós-colheita tem sido controlada com o uso de revestimento comestível com carvacrol aumentando a conservação microbiológica do fruto (FAKHOURI et al., 2015; MARTÍNEZ-ROMERO et al., 2006). Carvacrol é um antimicrobiano natural extraído de plantas aromáticas, como orégano e tomilho, que atua como conservante sendo qualificado como seguro pela Food and Drugs Administration (FDA) (SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015). Estudos anteriores, do grupo de pesquisa deste trabalho, mostraram que o revestimento comestível à base de amido de mandioca / gelatina contendo carvacrol inibiu o crescimento de *Colletotrichum sp* em morangos (BRETSCHNEIDER et al., 2019, ROMIO et al., 2017). Neste contexto, com o intuito de melhorar a conservação microbiológica do tomate o objetivo deste trabalho foi determinar o efeito do revestimento comestível à base de amido de mandioca / gelatina com propriedades antifúngicas no desenvolvimento de doenças pós-colheita em tomates causadas por *A. alternata*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de tomate uva (Sweet Grape®) adquiridos no comércio local de Francisco Beltrão - PR, foram selecionados com base em tamanho homogêneo, maturidade, cor e ausência de lesões. A solução de revestimento foi preparada de acordo com Romio et al. (2017) utilizando fécula de mandioca (Pinduca Alimentos, Brasil), gelatina tipo A (Gelita, Brasil), glicerol (Synth, Brasil) e carvacrol (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), Miglyol 812 (Sasol, Alemanha) e lecitina (Alfa Aesar, Estados Unidos). Condições assépticas e água estéril foram aplicadas para produzir a solução de revestimento ativo (BRETSCHNEIDER et al., 2019). Para análise antifúngica, foi preparado um revestimento comestível à base de fécula de amido / gelatina com 3 concentrações distintas de antifúngico natural. A atividade antifúngica *in vitro* foi avaliada por ensaio de inibição do crescimento em meio líquido com a microplaca de 96 poços, conforme descrito por Fieira et al. (2013), com algumas modificações (BRETSCHNEIDER et al., 2019).

Resumidamente, 10 µL de revestimento comestível branco ou revestimento comestível ativo foram adicionados a 80 µL de *A. alternata* (CCT 2816) ( $1 \times 10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>) em caldo de batata dextrose totalizando um volume final de 100 µL. O controle positivo empregado foi natamicina (Delvocid®) nas concentrações de 0,0078, 0,016, 0,031, 0,063, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 mM. Para controle negativo, revestimento comestível ou natamicina foram substituídos por água estéril. O crescimento de fungos foi avaliado usando cloreto de 2,3,5-tetrazólio (TTC). A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada, após incubação a 25 °C por 96 h. A CIM é a menor concentração de amostra impedindo o crescimento antifúngico visível. Para determinar a concentração fungicida mínima (CFM), o conteúdo total do poço que não apresentou crescimento fúngico foi removido e

inoculado em ágar (método de placa espalhada) na condição de crescimento ideal de *A. alternata*. Após 7 dias de incubação, as colônias foram contadas. A CFM foi determinada como a concentração em que não houve crescimento na placa. Para o ensaio *in vivo*, 165 tomates uva foram superficialmente desinfetados mergulhando-os em solução de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 3 min, enxaguando com água destilada estéril e secando-os à temperatura ambiente. Então, os frutos foram imersos em solução de revestimento por 2 minutos e drenados novamente. 5 tratamentos foram preparados para ensaio *in vivo* (Tabela 1).

Tabela 1 – Revestimento comestível à base de amido de mandioca/ gelatina e tratamento controle utilizado no ensaio *in vivo*

Tratamento	Código
0,60 mg carvacrol. g <sup>-1</sup> solução de revestimento	A
0 mg carvacrol. g <sup>-1</sup> solução de revestimento (branco)	B
Controle (tomates uva sem revestimento)	C
0,30 mg carvacrol. g <sup>-1</sup> solução de revestimento	D
0,15 mg carvacrol. g <sup>-1</sup> solução de revestimento	E

Fonte: Autores (2019).

Um dano (2 mm de largura por 3 mm de profundidade) foi feito em cada fruto. Neste dano foi inoculado *A. alternata*, colocando 10 microlitros de uma suspensão de esporos contendo  $1 \times 10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>. Os frutos foram colocados em embalagens plásticas de polipropileno (previamente desinfetadas com etanol a 70%) e incubadas a 25 °C. O efeito dos revestimentos comestíveis na incidência da doença foi avaliado diariamente durante 5 dias. Os dados de incidência de doença foram expressos como a porcentagem de frutos que apresentaram sintomas de podridão fora do número total de frutos em cada tratamento. Cada tratamento incluiu três repetições de 11 frutos cada. Os dados antifúngicos *in vivo* foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foi utilizado para comparar os valores médios em diferentes intervalos de tratamento e armazenamento ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa Statistica versão 7.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados anteriores do grupo de pesquisa mostraram que o carvacrol exibiu atividade antifúngica contra *A. alternata* (CIM e CFM = 563 µg.mL<sup>-1</sup>) (STADLER et al., 2019). Assim, como os resultados CIM e CFM da análise antifúngica *in vitro* para *A. alternata* foram 0,3 mg de carvacrol. g<sup>-1</sup> solução de revestimento e 0,6 mg de carvacrol. g<sup>-1</sup> solução de revestimento, respectivamente, pode-se dizer que o carvacrol é responsável pela expressão da atividade antifúngica. Resultados semelhantes foram relatados por Bretschneider et al., (2019) em análise antifúngica utilizando *Colletrochium* sp. Em outros trabalhos, a película comestível de quinoa / quitosana com timol (isômero de carvacrol) nanopartículas foi capaz de inibir o crescimento micelar e a esporulação de um dos fungos deteriorantes de tomates (*Botrytis cinerea*) (ROBLEDO et al., 2018; MEDINA et al., 2019). Ademais, embalagem com filme de carvacrol baseado em poliamida 6 apresenta eficácia antifúngica *in vitro* contra *A. alternata* (SHEMESH et al., 2016).

De modo a confirmar os resultados promissores da análise *in vitro* e dos dados da literatura, foi realizado um ensaio antifúngico (análise *in vivo*) para determinar qual o revestimento ativo que mantém as propriedades antifúngicas nos tomates. Como esperado, a deterioração dos frutos aumentou ao longo dos dias para todos os tratamentos. O controle (tomate não revestido) foi totalmente deteriorado no terceiro dia, indicando que o revestimento tem ação protetora contra danos físicos aos frutos e, assim, diminui a incidência de doenças fúngicas (Tabela 02).

Tabela 2 – Incidência da doença (%) ≠ de tomate controle e revestido

Dia	Tratamento*				
	A	B	C	D	E
1	0,00 <sup>Ca</sup> ± 0,00	0,00 <sup>Da</sup> ± 0,00	0,00 <sup>Da</sup> ± 0,00	0,00 <sup>Ca</sup> ± 0,00	0,00 <sup>Da</sup> ± 0,00
2	9,09 <sup>Cc</sup> ± 9,09	27,27 <sup>Cb</sup> ± 0,00	51,51 <sup>Ca</sup> ± 5,24	9,09 <sup>Cc</sup> ± 9,09	39,39 <sup>Cab</sup> ± 5,25
3	48,48 <sup>Bc</sup> ± 5,24	78,78 <sup>Bb</sup> ± 10,49	100,00 <sup>Ba</sup> ± 0,00	63,63 <sup>Bbc</sup> ± 15,74	78,78 <sup>Bb</sup> ± 5,25
4	100,00 <sup>Aa</sup> ± 0,00	100,00 <sup>Aa</sup> ± 0,00			

\* Para todas as abreviaturas de tratamento, ver material e método. Resultados expressos como média ± desvio padrão. Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Letras maiúsculas na mesma coluna = diferenças para o mesmo tratamento. Letras minúsculas na mesma linha = diferenças entre os tratamentos durante o mesmo dia (teste de Tukey).

Fonte: Autores (2019).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o tratamento B e o tratamento E, podendo-se dizer que a concentração de 0,15 mg de carvacrol. g<sup>-1</sup> solução de revestimento não tem efeito significativo contra *A. alternata*. No entanto, o revestimento é um fator significativo de diferença pois, o tratamento E foi mais eficaz do que o tratamento C (revestimento sem carvacrol). Pode-se dizer que o tratamento mais eficaz foi o tratamento D pois, quando comparado com o A, não houve diferença estatisticamente significativa. Curiosamente, quanto menor a concentração de carvacrol na solução de revestimento, maior a aceitação sensorial dos frutos revestidos, já que se sabe que o carvacrol altera o aroma e o sabor dos alimentos. (PASSARINHO et al., 2014). Após três dias, o tratamento C apresentou 100% de incidência da doença, enquanto os tomates revestidos apresentaram redução na manifestação da doença característica de *A. alternata*. Os resultados são consistentes com os relatados de outros estudos usando revestimento comestível contendo carvacrol para preservação pós-colheita de tomate. (BARRETO et al., 2016; FAGUNDES et al., 2015; SHEMAH et al., 2016). O mesmo revestimento ativo foi capaz de controlar o crescimento de *Colletotricum* sp em morangos (0,3 mg carvacrol. g<sup>-1</sup> solução de revestimento) (BRETSCHNEIDER et al., 2019).

## CONCLUSÃO

O revestimento comestível à base de amido de mandioca / gelatina contendo carvacrol é capaz de inibir o crescimento de *A. alternata* a 0,3 mg de carvacrol. g<sup>-1</sup> de solução de revestimento para ensaio antifúngico *in vivo* e *in vitro*. Os resultados indicam que o revestimento ativo comestível é uma alternativa viável para prolongar a vida útil do tomate no período de pós-colheita. Além disso, como a concentração de carvacrol é baixa, pode apresentar um impacto mínimo sobre os

atributos sensoriais do fruto. Os próximos passos deste trabalho serão avaliar os indicadores sensoriais de tomate no período pós-colheita com este revestimento comestível. E repetir as análises com o microrganismo *Botrytis cinerea* pois, junto com *A. alternata* são os principais responsáveis por dano microbiológico em tomates.

### AGRADECIMENTOS

A Felipe Bretschneider e a Bianca Piva pelo apoio nas análises microbiológicas. À UTFPR pelo espaço físico. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico por conceder a bolsa viabilizando o projeto.

### REFERÊNCIAS

AHMED, F. A.; SIPES, B. S.; ALVAREZ, A. M. Postharvest diseases of tomato and natural products for disease management. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 4, p. 684-691, 2017.

ALVARENGA, A. R. M. **Tomate**: Produção em campo, casa de vegetação e hidroponia, 2ª ed. Lavras: Universitária de Lavras. 2013.

BARRETO, T. A.; ANDRADE, S. C.; MACIEL, J. F.; ARCANJO, N. M.; MADRUGA, M. S.; MEIRELES, B.; CORDEIRO, Â. M.; SOUZA, E. L.; MAGNANI, M. A chitosan containind essential oil from *origanum vulgare* L. to control postharvest mold infections and keep the quality of cherry tomato fruit. **Frontiers in Microbiology**, v.7, n.1724, p. 1 – 14, 2016.

BRETSCHNEIDER, F. G. B., OLIVEIRA, L., ALFARO, A. T., ROMIO, A. P., MACHADO-LUNKES, A. Atividade Antifúngica *in vitro* e *in vivo* de revestimento comestível ativo contra *Colletotrichum* sp. **Higiene Alimentar**, v.33, p.2687-2691, 2019.

FAGUNDES, C.; PALOU, L.; MONTEIRO, A. R.; PÉREZ-GAGO, M. B. Hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible coatings formulated with antifungal food additives to reduce alternaria black spot and maintain postharvest quality of cold-stored cherry tomatoes. **Scientia Horticulturae**, v. 193, n. 1, p. 249 – 257, 2015.

FAKHOURI, F. M.; MARTELLI, S. M.; CAON, T.; VALASCO, J. I.; MEI, L. H. I. Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes. **Postharvest Biological and Technology**, v.109, n. 2, p. 57-64, 2015.

FIEIRA, C.; OLIVEIRA, F.; CALEGARI, R. P.; MACHADO, A.; COELHO, A. R. In Vitro and In Vivo antifungal activity of natural inhibitors against *Penicillium expansum*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n. 1, p. 40-46, 2013.

MARTÍNEZ-ROMERO, D.; GUILLÉN, F.; VALVERDE, J. M.; BAILÉN, G.; ZAPATA, P.; SERRANO, P.; CASTILLO, S.; VALERO, D. Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 144- 148, 2006.

MEDINA, E.; CARO, N.; ABUGOCH, L.; GAMBOA, A.; DÍAZ-DOSQUE, M.; TAPIA, C. Chitosan thymol nanoparticles improve the antimicrobial effect and the water vapour barrier of chitosan-quinoa protein films. **Journal of Food Engineering**, v. 240, n. 1, p. 191 – 198, 2019.

MORETTI, C. L.; OLIVEIRA, Domingos A. de; VIERIA, Jairo V.; NASCIMENTO, Warley M. Cores e sabores: a importância nutricional das hortaliças. **Embrapa Hortaliças**, Brasília, n. 2, 2012.

PASSARINHO, A. T. P.; DIAS, N. F.; CAMILOTO, G. P.; CRUZ, R. S.; OTTONI, C. G. MORAES, A. R. F. Sliced Bread preservation through oregano essential oil containing sachet, **Journal of Food Process Engineering**, n. 37, p. 53-62, 2014.

ROBLEDO, N.; VERA, P.; LÓPEZ, L.; YAZDANI-PEDRAM, M.; TAIPA, C.; ABUGOCH, L. Thymol nanoemulsions incorporated in quinoa protein/chitosan edible films; antifungal effect in cherry tomatoes. **Food Chemistry**, v. 246, n. 1, p. 211 – 219, 2018.

ROMIO, A. P.; MACHADO-LUNKES, A.; BRUSAMARELLO, C. Z.; BERTAN, L. C.; OLIVEIRA, L.; ASSIS, O. B.; TÉO, T. Encapsulação do carvacrol em filmes comestíveis de amido de mandioca e gelatina. **Embrapa Instrumentação**, São Carlos, 2017. In: IX Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio.

SHEMESH, R.; KREPKER, M.; NITZAN, N.; VAXMAN, A.; SEGAL, E. Active packaging containing encapsulated carvacrol of control of postharvest decay. **Postharvest Biology and Technology**, v.118, n. 1, p. 175 – 182, 2016.

STADLER, F., ROMIO, A. P., HASHIMOTO, E. E., SANTOS, E. C., MACHADO-LUNKES, A. Efeito combinado de carvacrol e tiabendazol contra *Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium solani* e *Alternaria alternata*. **Higiene Alimentar**, v.33, p.2774-2778, 2019.

SUNTRES, Z. E.; COCCIMIGLIO, J.; ALIPOUR, M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 304-318, 2015.