



Instituto Federal de Brasília
Campus Gama
Licenciatura em Química

Benedita Cardoso de Sousa

REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS À BASE DE AMIDO DE MANDIOCA E KEFIR
DE ÁGUA: APLICAÇÃO NA CONSERVAÇÃO DE MORANGOS PÓS-COLHEITA E
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.

Brasília
2019

Benedita Cardoso de Sousa

REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS À BASE DE AMIDO DE MANDIOCA E KEFIR
DE ÁGUA: APLICAÇÃO NA CONSERVAÇÃO DE MORANGOS PÓS-COLHEITA E
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao Curso de Licenciatura
Plena em Química do *Campus* Gama do
Instituto Federal de Brasília como
requisito parcial para obtenção do título
de Licenciada em Química.

Orientador: Prof. M. Sc. José Giovanni
Leite de Brito.

Brasília
2019

SOUSA, Benedita Cardoso

Revestimento comestíveis à base de amido de mandioca e kefir de água: Aplicação na conservação de morangos pós – colheita e atividade antibacteriana / Benedita Cardoso de Sousa ; orientação Prof. Me. José Giovanni Leite de Brito — Brasília, 2019

64 f.

Orientador: Prof. Me. José Giovanni Leite de Brito.

Trabalho de Conclusão do Curso (Graduação — Licenciatura em Química)
— Instituto Federal de Brasília, Campus Gama, 2019.

1. Cobertura filmogênica. 2. Morango *in natura*. 3. Kefir. I. BRITO, José Giovanni Leite, orient. II. Título.

Benedita Cardoso de Sousa

REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS À BASE DE AMIDO DE MANDIOCA E KEFIR
DE ÁGUA: APLICAÇÃO NA CONSERVAÇÃO DE MORANGOS PÓS-COLHEITA E
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao Curso de Licenciatura
Plena em Química do *Campus* Gama do
Instituto Federal de Brasília como
requisito parcial para obtenção do título
de Licenciada em Química.

Aprovado em: 04/12/2019

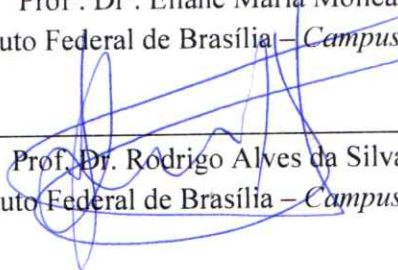
BANCA EXAMINADORA



Prof. M. Sc. José Giovanni Leite de Brito – Orientador
Instituto Federal de Brasília – *Campus* Gama



Prof.^a Dr.^a Eliane Maria Molica
Instituto Federal de Brasília – *Campus* Gama



Prof. Dr. Rodrigo Alves da Silva
Instituto Federal de Brasília – *Campus* Gama

Brasília
2019

Dedico este trabalho, a minha família, em especial a minha mãe, Antonia e meu pai, Sebastião, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos da minha vida. Ao meu irmão Camilo e minha cunhada Adriana, pela ajuda e apoio durante essa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre presente na minha vida, me ajudando a superar os obstáculos imposto pela vida.

Aos meus pais, Antonia e Sebastião, pelo amor e cuidado dedicado a mim, por sempre me apoiarem nas minhas escolhas. A minha mãe por sempre me mostrar que o melhor caminho é sempre o da educação.

Aos meus irmãos, Ronaldo, Eliane e Camilo, por estarem sempre me apoiando e me encorajando a seguir em frente.

Agradeço em especial ao meu irmão Camilo e sua esposa Adriana, por terem aberto as portas de sua casa para mim, e me ajudado a concretizar meu sonho. Obrigada por todo apoio, paciência e compreensão, vocês agora fazem parte da minha história.

Ao meu orientador, Prof. M. Scr. José Giovanni, por ter aceito me orienta e por ter acreditado em mim. Obrigada por sempre se mostrar disponível pelo apoio e ensinamentos.

À Professora Eliane Maria Molica, por ter conseguido os morangos junto aos fornecedores e pela ajuda no laboratório de alimentos.

À técnica de laboratório Elaine Nascimento Aquino, pela imensa ajuda na parte de microbiologia, por ter conseguido dos materiais e reagentes para realização das análises. Muito obrigada, sua ajuda foi primordial para concretização deste trabalho.

À todos os professores do IFB do curso de Licenciatura em Química que contribuíram para minha formação profissional. Em especial à professora **Rosana Andrade** pela paciência e incentivo no primeiro semestre do curso.

Ao professor **Elvis Boes**, por sempre responder meus e-mails, esclarecendo minhas dúvidas e também obrigada pelo presente do livro.

Ao professor **Breno Cunha** pelas sábias palavras de incentivo e encorajamento.

À professora **Nizamara Simenremis**, pelas ótimas aulas ministrada durante o curso e, pelas broncas quando necessário.

Ao professor **Rodrigo Alves**, pelas excelentes explicações durante as aulas de Química Orgânica II, e por sempre se mostrar disponível a esclarecer as dúvidas durante as aulas.

Ao professor **Marley**, pelas boas conversas e orientações.

Às amigas de curso, Thatiane Dorneles, Regina Sales, Camilla Thainan, Grazielle Adrianna, Dayane Mayara, Jamilla Farrapo e Patrícia Rêgo, pelo apoio, pelas boas conversas,

parceria e companheirismo. Muita obrigada pelos momentos agradáveis que passamos juntas. Vou levá-las sempre no meu coração.

Ao amigo Thiago Pereira, por sempre se mostrar disponível a me ajudar quando solicitado.

RESUMO

O interesse pelo desenvolvimento de filmes e coberturas comestíveis cresceu significativamente nos últimos anos, devido principalmente à crescente demanda por alimentos de alta qualidade, e também devido às oportunidades de se criar um novo mercado de coberturas para frutos. Nesse contexto, este trabalho estudou a utilização de revestimentos comestíveis à base de amido de mandioca e de kefir como uma alternativa para aumentar a conservação pós-colheita de morangos armazenados sob refrigeração. A atividade antimicrobiana das coberturas também foi avaliada, bem como o seu potencial antibacteriano contra o patogênico *E. coli*. Todos os revestimentos desenvolvidos mostraram, de uma forma geral, boa aderência aos frutos. Os revestimentos T₃ e T₄ proporcionaram aos frutos um brilho mais intenso em relação aos tratamentos T₁ e T₂, o que é um aspecto positivo no que diz respeito à atratividade para comercialização. Foi possível observar que durante o período de armazenamento houve um aumento crescente de perda de massa dos frutos para todos os tratamentos, sendo observada uma maior perda de massa no 9º e no 13º dia de armazenamento. As coberturas de kefir, tanto no modo autoclavado quanto no modo não-autoclavado, interferiram significativamente no crescimento da *E. coli*. O crescimento foi fortemente inibido, sendo mais efetivo nas concentrações 1,0 x 10⁸ UFC/mL a 1,0 x 10² UFC/mL, e na concentração 1,0 x 10⁻¹ UFC/mL, para ambas as condições testadas. Não se observou nenhum crescimento bacteriano nas placas de petri quando o tratamento T₃ foi empregado, o que significa que no revestimento de amido de mandioca a 3% não há a presença de bactérias pertencentes ao grupo gram-negativas. O tratamento composto por amido conseguiu ainda inibir o crescimento de *E. coli* em condições em autoclave. Todos os estudos microbiológicos foram assistidos por testes estatísticos (ANOVA). Os estudos de desenvolvimento de novas formulações de revestimentos comestíveis com valor nutricional agregado são fundamentais para o alcance de novas tecnologias de conservação para frutos perecíveis como o morango. Os resultados animadores encontrados com este trabalho pavimentam caminho para o desenvolvimento de um produto alimentício que, além de minimizar as perdas e elevar a competitividade, possui um enorme potencial para atender aos requisitos de qualidade de um mercado cada vez mais exigente de frutos *in natura*.

Palavras-chave: Cobertura filmogênica. Morango *in natura*. Kefir.

ABSTRACT

The interest on the development of edible films and coatings has significantly grown in the past few years, due mainly to the increasing demand for high-quality foods, as well as to the opportunities of establishing a new market for fruit coating. In this context, this work has studied the use of edible kefir-based and starch-based coatings as an alternative to improve the post-cropping conservation of strawberries in cold storage conditions. The films' antimicrobial activity and its antibacterial potential against the *E. coli* pathogen were also evaluated. In general, all the developed coatings showed good adherence to the fruits. Coatings T₃ and T₄ provided the strongest bright in comparison to coatings T₁ and T₂. This is a positive aspect regarding to attractiveness for commercialization. For all treatments, it was possible to observe an increasing growth in the loss of mass during the storage period, with the highest loss occurring in the ninth and thirteenth storage day. Water-kefir coatings, in both autoclaved and no-autoclaved modes, have significantly interfered in *E. coli* growth. The growth was strongly inhibited, and thus more effective, when the concentration used was $1,0 \times 10^{-1}$ UFC/mL and in the $1,0 \times 10^8$ UFC/mL – $1,0 \times 10^2$ UFC/mL range. No bacterial growth was observed in the petri dish when treatment T₃ was employed, which means that the 3% starch film has potent activity against gram-negative bacteria. The starch treatment was also able to inhibit *E. coli* growth in autoclaved conditions. All microbiological studies were followed by statistical analyses. The research on the development of new formulas to edible coatings with nutritional value-added is essential to reach new technologies for the conservation of perishable fruits like strawberry. The encouraging results found in this work pave the pathway for the development of a food product that can both reduce losses and increase competitiveness. Besides, it has a tremendous potential to meet the quality requirements of an increasingly demanding market of natural products.

Keywords: Filmogenic coverage. *In natura* strawberry. Kefir.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alguns flavonóides presentes no morango.	5
Figura 2 – Estrutura das antocianinas cianidina 3-glucosídeo e pelargonidina 3-glicosídeo.	6
Figura 3 – Estrutura química da amilose.	6
Figura 4 – Estrutura química da amilopectina.	7
Figura 5 – Influência do tratamento hidrotérmico com excesso de água sobre o estado do amido.	8
Figura 6 – Estrutura química do dextrano.	9
Figura 7 – Sequência ilustrativa da formação de uma cobertura comestível.	11
Figura 8 – Fluxograma do cultivo dos grãos de kefir em água e açúcar mascavo.	13
Figura 9 – Imersão dos morangos nas soluções dos revestimentos comestíveis.	15
Figura 10 – Esquema da avaliação ELISA.	19
Figura 11 – Morangos com revestimentos tratamento T ₁ (a), tratamento T ₂ (b), tratamento T ₃ (c) e tratamento T ₄ (d).	20
Figura 12 – Coloração dos morangos no 1º dia de armazenamento. (a) Controle T ₁ , (b) tratamento T ₂ , (c) Tratamento T ₃ , (d) Tratamento T ₄ .	21
Figura 13 – Coloração dos morangos no 5º dia de armazenamento. (a) Controle T ₁ , (b) tratamento T ₂ , (c) Tratamento T ₃ , (d) Tratamento T ₄ .	22
Figura 14 – Coloração dos morangos no 9º dia de armazenamento. (a) Controle T ₁ , (b) tratamento T ₂ , (c) Tratamento T ₃ , (d) Tratamento T ₄ .	23
Figura 15 – Coloração dos morangos no 13º dia de armazenamento. (a) Controle T ₁ , (b) tratamento T ₂ , (c) Tratamento T ₃ , (d) Tratamento T ₄ .	23
Figura 16 – Cor dos morangos durante o período de armazenamento.	24
Figura 17 – Perda de massa dos morangos durante o período de armazenamento.	26
Figura 18 – Valores de pH dos morangos durante o período de armazenamento.	27
Figura 19 – Acidez titulável dos morangos durante o período de armazenamento.	29
Figura 20 – Teores de sólido solúveis totais dos morangos durante o período de armazenamento.	31
Figura 21 – Crescimento bacteriano em Agar Macconkey do kefir autoclavado (a), e kefir não-autoclavado (b).	32
Figura 22 – Crescimento bacteriano em Agar Nutriente. Kefir autoclavado (a), e kefir não-autoclavado (b).	32
Figura 23 – Crescimento bacteriano (<i>E. coli.</i>) após 24 horas.	33
Figura 24 – Crescimento bacteriano (<i>E. coli.</i>) em Ágar Macconkey no tempo de 24 horas para T ₂ .	34
Figura 25 – Crescimento bacteriano (<i>E. coli.</i>) em Ágar Macconkey no tempo de 24 horas para T ₂ .	35
Figura 26 – Crescimento bacteriano (<i>E. coli.</i>) após 48 horas.	36

Figura 27 – Inibição do crescimento bacteriano (%) após 24 horas de incubação.	37
Figura 28 – Inibição do crescimento bacteriano (%) após 48 horas de incubação.	38
Figura 29 – Crescimento bacteriano em Agar Macconkey. T ₃ autoclavado (a), T ₃ não autoclavado (b).	38
Figura 30 – Crescimento bacteriano em Ágar Nutriente. T ₃ autoclavado (a), T ₃ não autoclavado (b).	39
Figura 31 – Crescimento bacteriano após 24 horas para o tratamento T ₃ .	40
Figura 32 – Crescimento de bacteriano em Ágar Macconkey no tempo de 24 horas para T ₃ .	40
Figura 33 – Crescimento de bacteriano em Ágar Macconkey no tempo de 24 horas.	42
Figura 34 – Crescimento bacteriano após 48 horas.	43
Figura 35 – Inibição do crescimento bacteriano (%) após 24 horas de incubação.	43
Figura 36 – Inibição do crescimento bacteriano (%) após 48 horas de incubação	44
Figura 37 – Crescimento bacteriano em Agar Macconkey. T ₄ autoclavado (a), T ₄ não autoclavado (b).	45
Figura 38 – Crescimento bacteriano em Agar Nutriente. T ₄ autoclavado (a), T ₄ não autoclavado (b).	45
Figura 39 – Crescimento bacteriano após 24 horas	46
Figura 40 – Crescimento de bacteriano em Ágar Macconkey no tempo de 24 horas para T ₄ .	47
Figura 41 – Crescimento de bacteriano em Ágar Macconkey no tempo de 24 horas para T ₄ .	48
Figura 42 – Crescimento bacteriano após 48 horas para T ₄ .	49
Figura 43 – Inibição do crescimento bacteriano (%) após 24 horas de incubação para T ₄ .	49
Figura 44 – Inibição do crescimento bacteriano (%) após 48 horas de incubação para T ₄ .	50
Figura 45 – Inibição do Crescimento Microbiano (%) para o grupo autoclavado após 24 horas.	51
Figura 46 – Inibição do Crescimento Microbiano (%) para o grupo autoclavado após 48 horas.	52
Figura 47 – Inibição do Crescimento Microbiano (%) para o grupo não autoclavado após 24 horas.	53
Figura 48 – Inibição do Crescimento Microbiano (%) para o grupo não autoclavado após 48 horas	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição nutricional de morango (<i>Fragaria vesca L</i>) em 100 g.	5
Tabela 2 – Formulações dos revestimentos aplicados nos morangos.	14
Tabela 3 – Cor dos morangos durante o período de armazenamento.	22
Tabela 4 – Perda de massa (%) dos morangos durante o período de armazenamento.	25
Tabela 5 – Média de pH dos morangos durante o período de armazenamento.	27
Tabela 6 – Acidez titulável dos morangos durante o período de armazenamento.	28
Tabela 7 – Teores de sólidos solúveis totais (° Brix), de morangos durante o período de armazenamento.	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FAO	Food and Agriculture Organization
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Ph	Potencial hidrogeniônico
CIM	Concentração inibitória mínima
INCRA	Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária
PET	Polietileno Tereftalato
SST	Sólidos solúveis totais
PPO	Polifenoloxidasas
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
BAL	Bactérias ácido lácticas
E.COLI	<i>Escherichia coli</i>
AM	Ágar <i>Macconkey</i>
NA	Ágar Nutriente
UFC	Unidade Formadora de Colônias

SUMÁRIO

	iii
AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Morango	3
2.1.1 Composição Química	4
2.2 Amido de Mandioca	6
2.3 Kefir	8
2.4 Revestimentos Comestíveis	10
3 OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo geral	12
3.2 Objetivos específicos	12
4 MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1 Manipulação e inoculação dos grãos Kefir	12
4.2 Produção e aplicação dos Revestimentos Comestíveis	13
4.3 Análises físicas e físico – químicas	15
4.3.1 Cor	15
4.3.2 Perda de Massa	16
4.3.3 pH	16
4.3.4 Acidez Total Titulável	16
4.3.5 Sólidos solúveis totais	17
4.4 Análises Microbiológicas	17
4.4.1 Preparação da cultura bacteriana	17
4.4.2 Preparação do inóculo	17
4.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	18

4.5 Análises estatísticas	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1 Análises físicas e físico-químicas	20
5.1.1 Cor	20
5.1.2 Perda de massa	24
5.1.3 pH	26
5.1.4 Acidez Total Titulável	28
5.1.5 Sólidos solúveis totais	30
5.2 Análises microbiológicas	31
5.2.1 Revestimento de kefir (T ₂)	31
5.2.2 Revestimento de amido de mandioca (T ₃)	38
5.2.3 Revestimento de amido de mandioca e kefir (T ₄)	45
5.2.4 Grupo autoclavado (T ₂ , T ₃ e T ₄)	51
5.2.5 Grupo não autoclavado (T ₂ , T ₃ e T ₄)	52
6 PROPOSTAS DE TEMAS PARA O ENSINO DE QUÍMICA	54
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	55
7.1 Conclusões	55
7.2 Perspectivas	57
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

O interesse pelo desenvolvimento de filmes e coberturas comestíveis (filmes biodegradáveis), cresceu significativamente nos últimos anos, devido principalmente à crescente demanda por alimentos de alta qualidade, e também devido às oportunidades de se criar um novo mercado de coberturas para frutos, tendo como matérias-primas produtos agrícolas (PALMU, 2003). Diante disso, a utilização de revestimentos ou coberturas comestíveis está sendo estudada como uma das alternativas no auxílio da conservação pós-colheita de frutas – principalmente as não – climatéricas, como é o caso do morango (FRIEDRICH, 2016).

O morango é um fruto que apresenta uma vida útil curta na condição pós-colheita, por ser considerado um fruto altamente perecível que possui atividade metabólica, grande sensibilidade ao clima e a danos mecânicos. Estes fatores, associados a uma alta suscetibilidade ao ataque de patógenos, principalmente fungos e bactérias, durante o cultivo e pós-colheita, ocasionam perdas econômicas, seguida de uma redução de qualidade final do fruto (FRIEDRICH, 2016). O emprego de revestimento sobre a superfície do fruto pode contribuir para a manutenção da sua qualidade e para o prolongamento de sua vida útil, pelo fato de o revestimento possuir excelentes propriedades de barreira, principalmente ao transporte de gases e vapor de água, entre outros fatores (FRIEDRICH, 2016).

Os revestimentos são soluções filmogênicas que geralmente são produzidos a partir de biopolímeros, como polissacarídeos, proteínas, lipídeos e variados (PALMU, 2003). Nesse contexto, o baixo custo, o fácil acesso e a biodegradabilidade são alguns dos fatores que tornam o amido um dos biopolímeros mais utilizados para a produção de revestimentos para frutos (MALI *et.al.*, 2010). As propriedades funcionais, mecânicas, nutricionais e sensoriais dos revestimentos podem ser modificadas com adição de substâncias químicas, plastificantes e agentes antimicrobianos, proporcionando uma melhor atuação das coberturas contra fungos e bactérias agentes responsáveis pela deterioração dos frutos (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Polissacarídeos de origem microbiana apresentam-se como novas perspectivas para melhorar as propriedades de barreira e mecânica dos revestimentos comestíveis. Os grãos kefir produzem substâncias com potencial antimicrobiano, que pode ser incorporado às formulações de revestimentos, visando à sua atuação como antibiótico. De acordo com

estudos realizados por Rodrigues e colaboradores (2015), os grãos de kefir durante a fermentação produzem bacteriocinas, que é um peptídeo antimicrobiano provenientes das bactérias ácido lácticas (BAL), que podem inibir bactérias Gram-negativa e Gram-positiva.

Diante disso, os estudos voltados para o desenvolvimento de novas formulações de revestimentos comestíveis com valor nutricional agregado, são fundamentais para o alcance de novas tecnologias de conservação para frutos perecíveis como o morango. Além de minimizar as perdas e elevar a competitividade, buscam atender às qualidades de um mercado cada vez mais exigente de frutos *in natura*.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo, avaliar os efeitos de revestimentos à base de amido de mandioca e kefir na conservação pós-colheita de morangos armazenados sob temperatura de refrigeração e a atividade antimicrobiana das coberturas. Para isso logo após a imersão dos morangos nos revestimentos foram realizadas análises física e físico-química (cor, perda de massa, pH, acidez titulável e sólidos solúveis), e a cada 4 dias até o 13 dia de armazenamento. Também foi avaliado o potencial antibacteriana das coberturas contra o patogênico *E. coli*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Morango

O morangueiro (*Fragaria Spp*) pertence à família das *rosáceas*, que possui espécies frutíferas de interesse econômico, tais como a macieira, a pereira e o marmeleiro. Seu fruto, o morango, é nativa das regiões de clima temperado da Europa e das Américas. No Brasil, a produção comercial do morango é feita em vários estados, a depender da adaptabilidade das cultivares ao clima. Os estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, se destacam como grandes produtores de morango (PINELI, 2009; ANTUNES et al., 2011). Segundo dados da FAO (2019), a produção de morangos no Brasil no ano de 2017 foi de 3390 milhões de toneladas.

O morango é uma das frutas de grande utilização na indústria alimentícia, graças à sua coloração, ao seu aroma e ao seu sabor agradável. O fruto é bastante valorizado pelo reconhecimento de suas propriedades nutracêuticas, assim como a uva e o mirtilo. O morango é considerado ainda uma das principais espécies em conteúdo de flavonoides, que são compostos fenólicos com atividade antioxidante, cujo consumo está associado à prevenção da maioria das doenças crônicas de risco e doenças degenerativas (ANTUNES *et al.*, 2011).

O ponto de colheita do morango tem influência direta com a durabilidade do fruto pós-colheita. O fruto é bastante delicado e pouco resistente, por possui epiderme delgada e muita água, contribuindo assim para o alto metabolismo, o que exige bastante cuidado durante a colheita. Se os frutos forem colhidos muito maduros, poderão se decompor muito rápido podendo chegar ao mercado com podridão, e se forem colhidos verdes, apresentaram alta acidez e sem aroma (DIAS *et al.*, 2007). Segundo Silva (2006), um metabolismo muito rápido, acarreta um rápido período de senescência do fruto, o que pode em parte ser controlado pela utilização revestimento comestíveis combinada com condições de armazenamento de baixa temperatura.

Conforme Lopes (2011), entre os fungos mais comuns relacionados ao apodrecimento pós-colheita de morangos destacam-se: *G. candidum*; *P. concavum*; *C. candelabrum*; *Penicillium sp.*; *A. niger*; *Aspergillus sp.*; *Phoma sp.*; *Mucor sp.*; *Rhizopus stolonifer*, e; *Cladosporium sp.*

O fungo *Rhizopus stolonifer* é considerado como o causador da doença podridão de rizópous em morangos. A doença ocorre principalmente após a colheita, mas também pode ocorrer ainda no campo. Os principais sintomas são a podridão mole e aquosa dos frutos, e o

desenvolvimento de mofo sobre os frutos (REIS; COSTA, 2011). Embora a doença não seja observada em campo, as estruturas do fungo podem ser espalhadas pelo vento e/ou com a ajuda de insetos das folhas infectadas, causando a infecção (FERREIRA, 2017).

2.1.1 Composição Química

Os alimentos de origem vegetal são ricos em compostos fitoquímicos, que apresentam atividades biológicas promissoras para a saúde, tais como atividade antioxidante, anti-inflamatória e hipocolesterolêmica. Entre esses compostos, destacam-se as catequinas presentes no chá verde, as antocianinas presentes nos frutos vermelhos, os flavonoides das hortaliças e as isoflavonas presentes na soja (SEERAM, 2006).

A busca por alimentos ricos em compostos bioativos e que possam trazer benefícios para a saúde tem atraído atenção tanto da comunidade científica como da indústria alimentícia. De acordo com a literatura o morango (*Fragaria Spp*) contém compostos fenólicos que possuem propriedades antioxidantes, anticâncer, antiateroscleróticas e propriedades antineurodegenerativas (SEERAM, 2006).

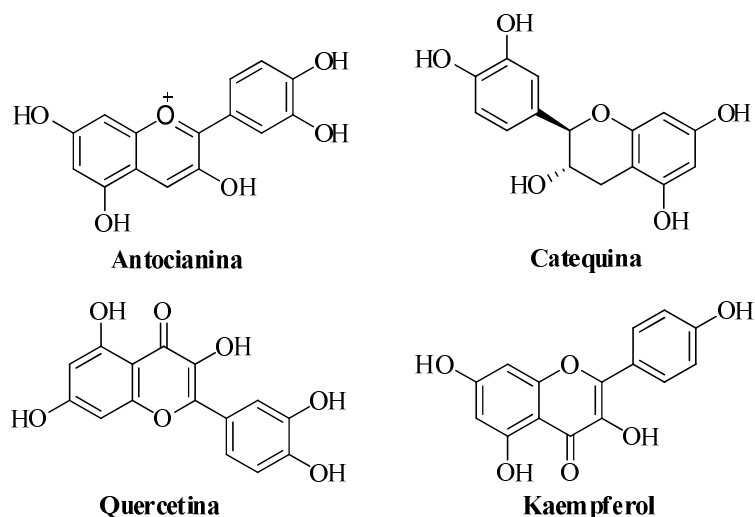
O morango é uma fruta muito importante na dieta mediterrânea em virtude de seu alto conteúdo de nutrientes essenciais e fitoquímicos benéficos à saúde, e que apresentam atividade biológica relevante na saúde humana. Entre os fitoquímicos presentes no morango, destacam-se as antocianinas e os elagitaninos como os principais compostos antioxidantes. Além disso, o morango apresenta vários componentes dietéticos importantes, tais como vitaminas e minerais (GIAMPIERI, 2012). O consumo de morango pode suprir a insuficiência de minerais, de vitaminas e de proteínas consideradas essenciais para uma boa saúde. De acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO, a composição nutricional de 100 g de morango (*Fragaria vesca L*) segue representada na Tabela 1 (NEPA/UNICAMP, 2006).

Tabela 1 – Composição nutricional de morango (*Fragaria vesca* L) em 100 g.

Composição nutricional	Quantidade em 100 g
Valor energético (Kcal)	30,0
Proteínas (g)	0,9
Lipídios (g)	0,3
Carboidratos (g)	6,8
Fibras alimentar (g)	1,7
Cinzas (g)	0,5
Cálcio (mg)	11,0
Magnésio (mg)	10,0

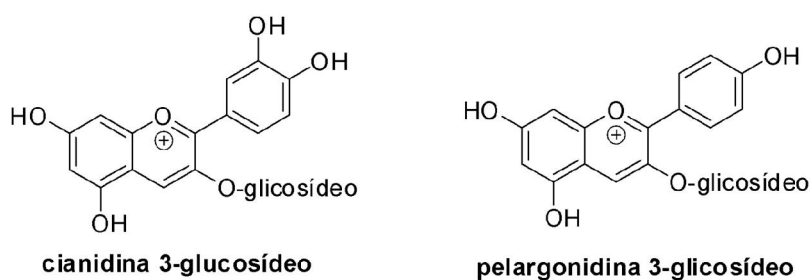
Em estudos realizados por Serream e colaboradores (2006), foi possível a identificação, por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), o ácido elágico, elagitaninos, antocianidinas e flavonóides como os principais compostos fenólicos presentes no morango. Sabe-se ainda que os flavonóides predominantes nos morangos são a antocianina, catequina, quercetina e kaempferol (Figura 1). Todos estes compostos são conhecidos como poderosos antioxidantes e, portanto, têm efeitos semelhantes aos do ácido elágico na eliminação de radicais livres (HANNUM, 2004).

Figura 1 – Alguns flavonóides presentes no morango.



Na literatura, são reportadas como as principais antocianinas encontradas no morango, a cianidina 3-glicosídeo e a pelargonidina 3-glicosídeo, as quais estão descritas na Figura 2 (CORDENUSI, 2005; GIL, 1997).

Figura 2 – Estrutura das antocianinas cianidina 3-glicosídeo e pelargonidina 3-glicosídeo.

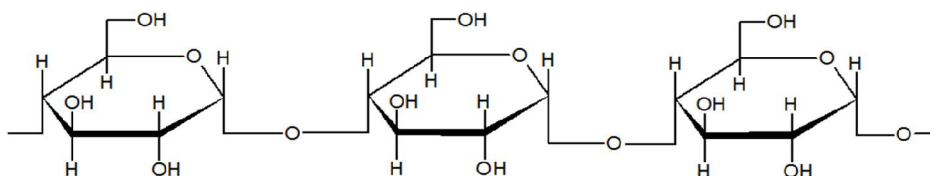


Contudo, os teores de compostos fenólicos nos frutos podem ser afetados pela ação de fatores genéticos e ambientais nas fases de pré e pós-colheita. Entre esses fatores importantes na fase pré-colheita destacam-se o tipo de cultivar, o ataque de pragas e parasitas, as práticas culturais, a incidência de luz e a temperatura ambiente. Em contrapartida, o estresse mecânico, a exposição à luz, e a temperatura de armazenamento podem influenciar na composição química dos frutos pós-colheita (PINELI, 2009).

2.2 Amido de Mandioca

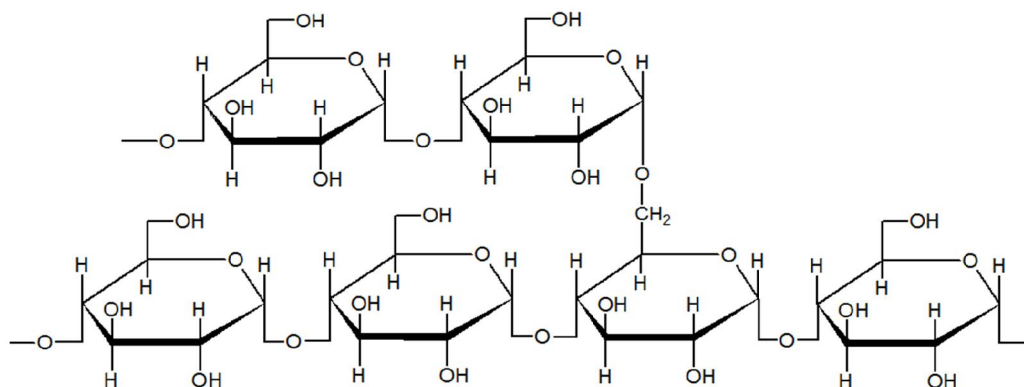
A fécula ou amido é um carboidrato de reserva energética de várias plantas, ou o produto amiláceo extraído das partes subterrâneas comestíveis dos vegetais (tubérculos, raízes e rizomas) (BRASIL, 1969). O amido é um polissacarídeo constituído de dois polímeros, a amilose e a amilopectina. Primeiro, a amilose (Figura 3), uma molécula linear formado por unidades de D-glicose e unidas por ligações glicosídicas do tipo $\alpha - (1 \rightarrow 4)$, com massa molar variando entre $1,5 \cdot 10^5$ a $2 \cdot 10^6$ (g/mol).

Figura 3 – Estrutura química da amilose.



O segundo polímero é a amilopectina (Figura 4), uma molécula ramificada formada por unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo $\alpha - (1 \rightarrow 4)$ e por ramificações em $\alpha - (1 \rightarrow 6)$, a cada 20 ou 30 resíduos de glicose. Seu peso molecular varia entre $4,1 \cdot 10^5$ a $2 \cdot 10^6$ (g/mol) (MARZZOCO; TORRES, 2015; KAPLAN, 1998).

Figura 4 – Estrutura química da amilopectina.



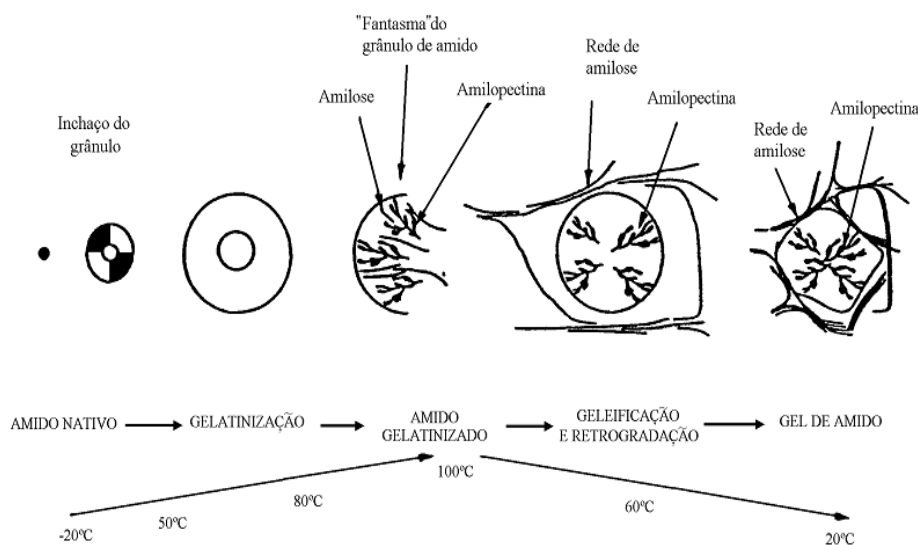
As moléculas de amilose e amilopectina são constituídas de dois grupos funcionais importantes: o grupo $-OH$, suscetível às reações de substituições e o grupo $C-O-C$ suscetíveis à reações de ruptura de cadeias. O grupo hidroxila da glicose tem caráter nucleofílico, o que favorece reações com esse grupo, obtendo-se modificações de várias propriedades. Ligação cruzada e ligações de hidrogênio do tipo $-OH$ são exemplos que mudam a estrutura da cadeia e aumentam a viscosidade do amido, reduzem a retenção de água e aumentam a resistência ao cisalhamento (SEBIO, 2003). As quantidades de amilose e amilopectina na mandioca ocorrem em diferentes proporções, dependendo da espécie da planta. O amido de mandioca apresenta teores de amilose variando entre 14–18% e de amilopectina variando entre 86–82%, e grânulos com diâmetro variando entre 3–30 μm e um diâmetro máximo de 15 μm (KAPLAN, 1998; GUINESI, 2006).

Segundo Gallant e colaboradores (1997), os grânulos de amido são formados de estruturas semicristalinas, constituídas de macromoléculas arranjadas na direção radial, onde as macromoléculas formam pontes de hidrogênio por estarem associadas paralelamente o que, por sua vez, resulta no aparecimento de regiões cristalinas. Entre estas áreas cristalinas existem as regiões amorfas, nas quais as moléculas não têm uma orientação particular. As áreas cristalinas mantêm a estrutura do grânulo e controlam o comportamento do amido na água (CIACCO; CRUZ, 1982; WURZBUR, 1989).

A produção de revestimento a partir do amido de mandioca, pode ser obtida pelo processo de gelatinização a uma temperatura de 70° C, seguido de resfriamento até atingir o equilíbrio térmico (CAMPOS *et.al.*, 2009). O aquecimento de uma suspensão aquosa de amido provoca a quebra das ligações de hidrogênio, que mantêm o arranjo molecular dentro

do grânulo (Figura 5). Os grupos –OH das unidades de glicose, que participam das áreas cristalinas, são hidratados provocando o inchamento do grânulo (TAPARELLI, 2005).

Figura 5 – Influência do tratamento hidrotérmico com excesso de água sobre o estado do amido.



Fonte: VICENTINI (2003).

Após a gelatinização, ocorre o processo da retrogradação, que são as transformações que ocorrem entre as moléculas de amilose e as ramificações da amilopectina durante o resfriamento do amido. As moléculas do amido começam a se reorganizar através de ligações de hidrogênio, favorecendo a formação de uma estrutura molecular mais ordenada, obtendo-se, assim, o gel de amido (TAPARELLI, 2005).

2.3 Kefir

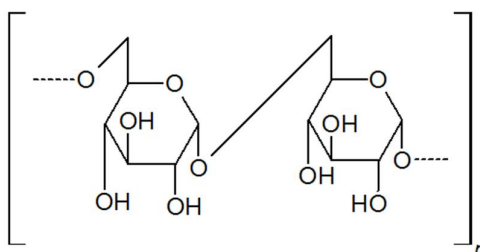
O kefir é um probiótico cujo consumo pode proporcionar benefícios para saúde, além de ser de grande interesse para a indústria alimentícia na atualidade. O consumo regular do kefir tem sido associado a uma série de atividades terapêuticas, podendo trazer vários benefícios para saúde (LOPITZOTSOA *et.al.*, 2006). O kefir pode ser cultivado em diferentes meios, sendo os mais comuns o leite, sucos de frutas e água com açúcar mascavo, em temperatura entre 10° C e 25° C (OLIVEIRA, 2016).

O kefir de água é uma bebida caseira fermentada à base de uma solução aquosa de sacarose. O inoculo de tais fermentações consiste em grânula macroscópica contendo ácido láctico e ácido acético, e bactérias e leveduras do gênero *Saccharomyces* que são

incorporados em uma matriz de exopolissacarídeo (EPS) (WALDHEER, 2010). O método tradicional de produção do kefir, decorre da adição dos grãos de kefir em um litro de leite ou um litro de água contendo duas colheres de açúcar mascavo. Desta forma, este alimento nutritivo pode ser preparado em casa de forma artesanal, permitindo incluir este produto funcional na alimentação diária da população brasileira, sobretudo nas famílias de baixa renda (SANTOS *et. al.*, 2012).

Os grãos contêm cerca de 11,5% de matéria seca, composta quase que inteiramente pelo homopolissacarídeo dextrano (Figura 6), um polissacarídeo formado por unidades de D-glicose unidos por ligações glicosídicas $\alpha - (1 \rightarrow 6)$ (PIDOUX *et.al.*, 1988). O dextrano é biossintetizado pela atuação de enzimas conhecidas com glicosiltransferases, que são exportadas para o meio extracelular pelo microrganismo produtor e, em presença de sacarose no meio, realizam a polimerização de resíduos de glicose (PAIVA, 2013).

Figura 6 – Estrutura química do dextrano.



O kefir vem sendo usado como um aditivo antimicrobiano na produção de revestimento, além de proteger as colheitas contra fungos e bactérias. Os probióticos repelem microrganismos patogênicos ao competir por sítio e nutrientes e impedem a ação de bactérias patogênicas e anaeróbias (FERNÁNDEZ *et. al.*, 2015; VIDYALAXME *et. al.*, 2014). Segundo Lopitzotosa e colaboradores (2006), o kefir apresenta atividade antibacteriana e antifúngica, apresentando ação antipatogênica efetiva contra *Salmonella*, *Helicobacter*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes* e *Streptococcus pyrogenes*.

Entre esses microrganismos destaca-se a *Escherichia coli* (*E. coli*) que é uma bactéria gram-negativa anaeróbia facultativa que tem como habitat natural o trato intestinal do homem e dos animais. Essa bactéria faz parte da família da *Enterobacteriaceae*, que entre as principais características destacam-se bacilos Gram-negativos que são capazes de fermentar a glicose produzindo gás e ácidos quando incubadas a 35-37° C. A presença de *E. coli* em alimentos deve ser avaliada sob dois parâmetros. Primeiro, deve ser verificado se a *E. coli* é

uma enterobactéria. Uma vez identificada no alimento, indica que a contaminação microbiana tem origem fecal e, portanto, esse alimento encontra-se em condições higiênicas insatisfatórias. O segundo parâmetro é verificar se a *E. coli* pertence ao grupo de bactérias patogênicas (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

2.4 Revestimentos Comestíveis

Os revestimentos comestíveis podem ser definidos como uma fina camada contínua formada ou depositada no alimento preparada a partir de materiais biológicos que agem como barreira a elementos externos (fatores como umidade e gases), e cuja função é proteger os alimentos contra a deterioração. Como consequência, a vida útil de prateleira dos alimentos acaba aumentando. Além disso, o emprego desses revestimentos comestíveis deve considerar algumas características relevantes, tais como: ser transparente; ter fácil aderência para que o fruto não se desprenda facilmente, e; não alterar o sabor e o aroma particular do alimento a ser consumido (PALMU, 2003; ALMEIDA, 2010; ASSIS *et. al.*, 2008). Em decorrência da biodegradabilidade, eles podem ser consumidos em conjunto com o alimento, podendo vir adicionados de nutrientes com o intuito de fortificar o produto, e ainda atuar como agentes antimicrobianos, bem como melhorar as características sensoriais dos alimentos (RODRIGUES, 2015).

Os revestimentos ou coberturas comestíveis não tem como objetivo substituir as embalagens sintéticas, mas sim a finalidade de atuar como coadjuvante, contribuindo para a preservação da textura e do valor nutricional dos frutos, reduzindo as trocas gasosas e a perda de água que resultam na perda de massa e a perda de voláteis responsáveis pelo “flavor” (sabor e aroma) do produto (CHITARRA; CHITARRA 2005).

Os revestimentos podem ser classificados como hidrofóbicos e hidrofílicos, sendo os hidrofílicos, materiais cujas estruturas químicas, apresentam uma predominância de grupos amino ou hidroxila e carboxila (NH_3 , OH , COO^-), caracterizados por ligações covalentes polares. Em virtude das características desses grupos funcionais, a cadeia carbônica apresenta sítios parcialmente carregados positivamente e outros carregados negativamente, fato que favorece o acúmulo e o rearranjo de moléculas polares em torno desses sítios. Alguns materiais que apresentam essas características são os polissacarídeos (ASSIS; BRITO, 2014).

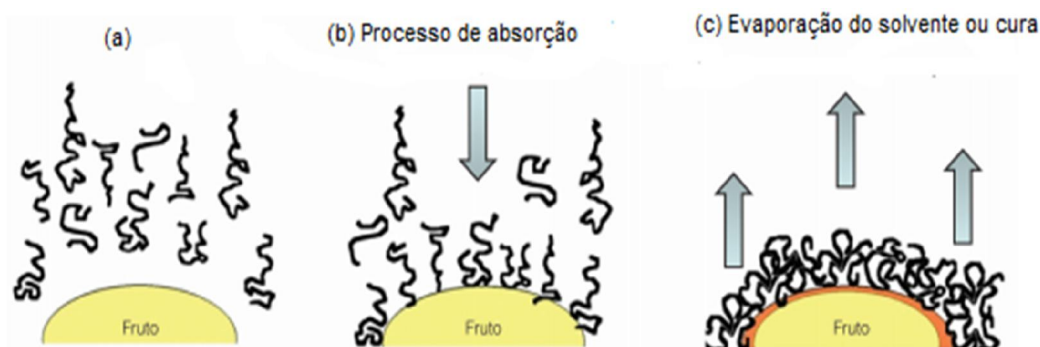
Os revestimentos hidrofóbicos são materiais formados por moléculas eletricamente neutras, ou seja, compostos que não possuem carga positiva ou negativa, incluindo os grupos alquilas ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, etc.) e compostos aromáticos. Como exemplos desses materiais,

destacam-se as proteínas hidrofóbicas (com uma predominância de substituintes polares), óleos e ácidos graxos parafinas e álcoois de cadeia longa (ASSIS; BRITO 2014).

A cobertura que se forma ao emergir uma fruta em uma solução filmogênica é determinada pelas espécies poliméricas dissolvidas no meio, estabelecendo ligações fracas e fortes com a superfície da fruta. Desse modo, o tipo de mecanismo predominante na formação da cobertura são as características do absorvente (a casca do fruto) e do absorvato (compostos diluídos na solução filmogênica).

De uma forma geral, destacam-se cinco interações possíveis ao se submergir um fruto em uma solução filmogênica: i) ligações de hidrogênio; ii) interações hidrofóbicas; iii) interações por forças dispersivas; iv) polarização de elétrons π , e; v) interações eletrostáticas (PARIA; KHILAR, 2004). O processo de formação do recobrimento segue representado na Figura 7, onde os tipos de interações podem ocorrer concomitantemente e em intensidades diferentes.

Figura 7 – Sequência ilustrativa da formação de uma cobertura comestível. Em (a) imersão do fruto em solução filmogênica (polímeros em solução). Em (b) atração entre o absorvato (composto diluído na solução filmogênica) e o absorvente (casca) por um dos possíveis mecanismos. (c) Formação da cobertura.



Fonte: ASSIS; BRITO (2014).

Os revestimentos comestíveis apresentam como propriedades funcionais retardar a migração de umidade, de gases oxidantes como O_2 e CO_2 , de óleos ou gorduras, e oferecer uma integridade estrutural adicional para os alimentos. Além disso, visam reter compostos aromáticos, funcionar como suporte para aditivos e oferecer nutrientes que possam melhorar as características sensoriais do produto através da incorporação de aromas, pigmentos ou outros aditivos, incluindo-se aí agentes antioxidantes e antimicrobianos (PALMU, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar os efeitos de revestimentos à base de amido de mandioca e kefir na conservação pós-colheita de morangos armazenados sob refrigeração e determinar atividade antibacteriana das coberturas.

3.2 Objetivos específicos

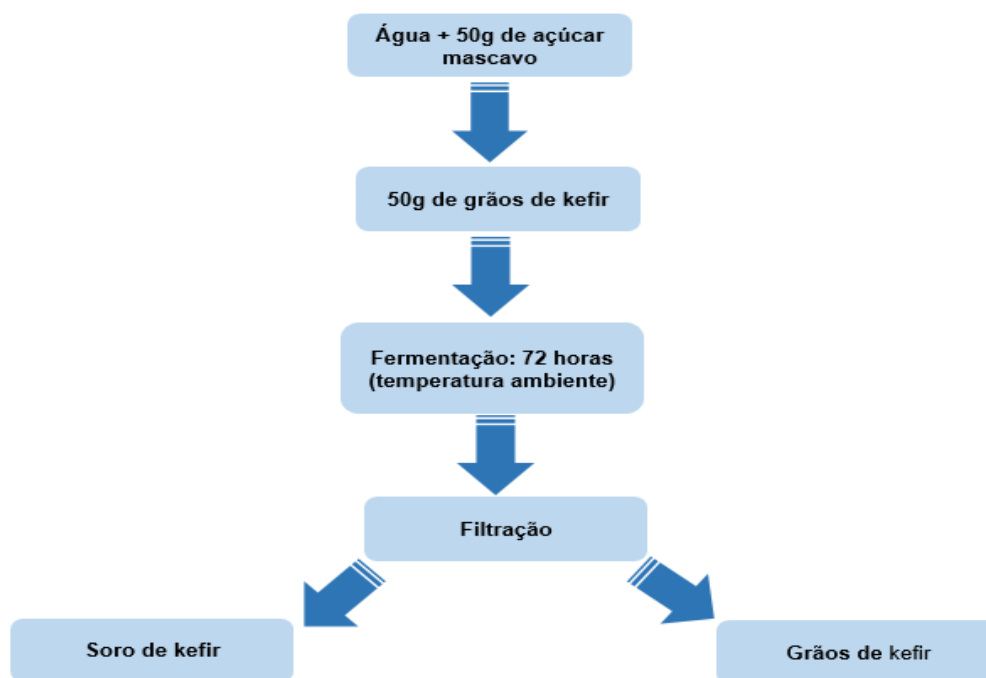
- Cultivar os grãos de kefir;
- Preparar os revestimentos comestíveis;
- Avaliar as propriedades físicas e físico-químicas (cor, perda de massa, pH, acidez total titulável e sólidos solúveis totais) dos morangos durante o período de armazenamento;
- Determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos revestimentos em relação à bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* autoclavado;
- Determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos revestimentos em relação à bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* não-autoclavado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Manipulação e inoculação dos grãos Kefir

Os grão de kefir usados neste trabalho foram obtidos por meio de doação feita pela Unidade de Processamento de Alimentos IV do Instituto Federal de Brasília – IFB *campus* Gama. As etapas de cultivo dos grãos de kefir segue demonstrado no Fluxograma (Figura 8)

Figura 8 – Fluxograma do cultivo dos grãos de kefir em água e açúcar mascavo.



Os grãos de kefir foram cultivados a partir da adição de 50 g de grão de kefir em 50 g de açúcar mascavo dissolvido em 1,5 L de água destilada, seguido de um período de fermentação de 72 horas em temperatura ambiente. Após esse período o soro de kefir era obtido através de filtração simples, utilizando uma peneira de plástico, obtendo assim a separação dos grãos do soro do kefir. Os grãos de kefir eram realimentados com 50 g de açúcar mascavo e 1,5 L de água destilada, esta rotina foi realizada até a conclusão do experimento.

4.2 Produção e aplicação dos Revestimentos Comestíveis

Os frutos da cultivar Osogrande (PINELI, 2009), foram adquiridos de produtores do INCRA 08 Brazlândia/ DF, os quais foram cultivados de acordo o sistema tradicional para morango. Os morangos foram colhidos em estágios de maturação comercial e armazenados em caixas específicas para a colheita (37 x 26 x 7 cm), segundo o produtor o tempo de

consumo *in natura* dos morangos é de 7 dias. Em seguida, foram selecionados em um galpão da propriedade sob temperatura ambiente e, levados para Unidade de Processamento de Alimentos IV do Instituto Federal de Brasília – IFB *Campus* Gama.

Os morangos foram selecionados de acordo com seu tamanho, cor, forma, nível de maturação e sanidade. Cada tratamento foi avaliado em triplicatas. Os frutos foram divididos em quatro grupos de tratamento, a saber: T₁, T₂, T₃ e T₄. As composições de cada tratamento seguem representadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Formulações dos revestimentos aplicados nos morangos.

Tratamento	Composição
T ₁	Sem revestimento (controle)
T ₂	Soro de kefir
T ₃	Amido de mandioca a 3%
T ₄	Amido de mandioca + água de kefir a 20%

O tratamento T₁ foi mantido como tratamento-controle, ou seja, não foi aplicado revestimentos comestíveis sob os morangos. Para os demais tratamentos, os revestimentos utilizados foram obtidos a partir de água de kefir e/ou solução de amido de mandioca a 3%. O revestimento de kefir, T₂, foi preparado com 400 mL de água de kefir separados dos grãos pelo processo de filtração simples. O revestimento T₃ foi obtido a partir de 60 g de amido de mandioca dissolvido em 2 L de água. Logo após, a mistura foi aquecida a 70° C com agitação até a gelatinização da solução (20-30 min), mantendo-se o sistema em temperatura ambiente até o alcance do equilíbrio térmico (CAMPOS. et.al., 2009). O revestimento de amido de mandioca a 3% + kefir a 20%, T₄, foi preparado a partir 1 L da solução de amido a 3% e 1 L de soro de kefir a 20%.

Foram utilizadas aproximadamente 200 g de amostras (morangos) para cada tratamento, em seguida os frutos foram imersos nas soluções, de acordo com cada tratamento por 2 minutos (Figura 9). A seguir, os frutos foram submetidos à secagem em uma tela de inox por 2 horas à temperatura ambiente. Logo após, os frutos foram acondicionados em bandejas de PET (Polietileno Tereftalato) transparente (190 cm x 120 cm x 63 cm), sem perfurações e armazenadas em refrigerador sob temperatura de aproximadamente 10 ± 2 °C e umidade relativa 85 ± 3% para simular o armazenamento condições comerciais.

Figura 9 – Imersão dos morangos nas soluções dos revestimentos comestíveis.



O delineamento experimental utilizado para os frutos foi inteiramente casualiado 4 x 4, sendo composto de 4 tratamentos (T₁, T₂, T₃ e T₄) com três repetições cada, e 4 períodos de avaliação durante o período de armazenamento refrigerado (1, 5, 9 e 13 dias). Foram realizadas análises física e físico – químicas logo após a imersão dos frutos nos revestimentos (1º dia), e a cada 4 dias até o 13º dia.

4.3 Análises físicas e físico – químicas

Cada tratamento foi preparado com dois frutos, em triplicata, para formar a unidade experimental para as análises químicas. Cada uma dessas unidades amostrais foi homogeneizada no misturador por 2 minutos para realizar a determinação do pH, acidez titulável e sólidos solúveis.

4.3.1 Cor

A mudança de coloração dos morangos foi realizada através de avaliação visual subjetiva, estabelecendo - se uma escala de cor, com pontuações para o nível de coloração e o aumento de outros pigmentos de acordo com o fruto, conforme já descrito por Chitarra e Chitarra (2005) para mangas. Os níveis utilizados para avaliação da coloração dos frutos foram organizados em uma escala de 1 a 4 por tonalidade, sendo: 1 – vermelho claro; 2 – vermelho padrão; 3 – vermelho com traços escuros; e 4 – vermelho escuro; e o uso de comparação visualmente por foto ao longo dos 13 dias de armazenamento.

4.3.2 Perda de Massa

A perda de massa foi determinada em porcentagem (%) pela diferença entre a massa inicial do dia zero e os demais dias de armazenamento. As porções foram pesadas em balança semi - analítica (Marte AD200) e, em seguida, a perda de massa acumulada durante cada período de armazenamento foi verificada de acordo com a Equação 1.

$$\text{perda de massa (\%)} = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

M_i: massa inicial da amostra no período zero em gramas

M_f: massa final da amostra os períodos de amostragens seguinte a massa inicial em gramas.

4.3.3 pH

O potencial hidrogeniônico (pH) foi determinado através do método potenciométrico, com peagâmetro microprocessador (AT-355). Utilizou-se 10 g da amostra e homogeneizando se a mesma em 100 mL de água destilada, e agitou-se bem a amostra. Em seguida, determinou-se o pH, segundo os métodos físico-químicos para análises em alimentos descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

4.3.4 Acidez Total Titulável

A análise de acidez foi determinada de acordo com os métodos físico-químicos para análises em alimentos descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Utilizou-se aproximadamente 10 gramas da amostra triturada e homogeneizada em 100 mL de água destilada. Em seguida, realizou-se uma titulação potenciométrica com a solução de NaOH 0,1 M, até uma faixa de pH (8,2–8,4). Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítricos de acordo com a Equação 2.

$$\% \text{ de Acidez} = \frac{V_x \times f \times M \times PM}{10 \times P \times n} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

V = volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação em mL

f = fator da solução de NaOH 0,1N

M = molaridade da solução de NaOH

PM = peso molecular do ácido correspondente em g (c= 192)

P = massa da amostra em g ou volume pipetado em mL

n = n° de hidrogênio ionizáveis (c=3)

4.3.5 Sólidos solúveis totais

A análise de sólidos solúveis totais (SST), foi determinada usando-se um refratômetro portátil (Refractometer EQT 010), e os resultados expressos em graus Brix (° Brix).

4.4 Análises Microbiológicas

Foram realizadas análises microbiológicas para cada tratamento, para se determinar o potencial antimicrobiano das coberturas. Foram utilizados o Ágar Macconkey, Agar Nutriente e caldo lactose como meios de culturas para avaliar a atividade antibacteriana dos revestimentos T₂, T₃ e T₄. Para a realização dos estudos microbiológicos foi utilizada a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* BETA LACTAMASE NEWP 0018. As avaliações foram feitas pelo método de turbidimetria em intervalos de 24 e 48 horas.

4.4.1 Preparação da cultura bacteriana

Para os estudos de reativação da bactéria, o meio de cultura foi reativado em caldo lactose e levado para incubação por 24 horas a 37° C. Para obter 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL de *E. coli* foi utilizado como padrão a escala de MacFarland (1,0 x 10⁸ UFC/mL). A cultura mãe foi diluída com uma solução salina (NaCl) 0,9 % até atingir uma turvação igual ou próxima a suspensão 0,5 da escala de MacFarland, contendo aproximadamente 1,0 x 10⁸ UFC/mL. Em seguida, foi realizada a leitura espectrofotométrica da bactéria a 630 nm para confirmação da concentração do microrganismo com a solução padrão de MacFarland

4.4.2 Preparação do inóculo

A diluição logarítmica do inoculo bacteriano foi realizada utilizando-se a técnica serial com sistema de Tubos Múltiplos. Inicialmente, preparou-se uma bateria de 10 tubos de ensaios e a estes foram adicionados 9 mL de caldo lactose. Em seguida, foram realizadas as diluições seriadas transferindo-se 1 mL da cultura mãe ($1 \text{ a } 2 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$) para os tubos contendo 9 mL de caldo lactose, obtendo assim a diluição 10^{-1} seguindo até a diluição de 10^{-10} (CZAMANSKI, 2003).

Foram organizadas 3 baterias com 10 microtubos de polipropileno (tubo *Eppendorf*), cada. A uma das baterias do inóculo bacteriano foram adicionados $4,5 \mu\text{L}$ de caldo lactose, na 2ª bateria foi adicionado $4,5 \mu\text{L}$ das soluções dos revestimentos autoclavada e na última bateria foi adicionado $4,5 \mu\text{L}$ das soluções dos revestimentos não autoclavada. Em seguida, foram contaminados com $4,5 \mu\text{L}$ de cada diluição serial logarítmica (10^{-1} a 10^{-10}) de *E. coli*, passando os mesmos para uma concentração de 50%. Posteriormente, os microtubos foram agitados e incubados em estufa bactericida a 36°C durante 24 horas.

Para se ter o controle do inóculo, ou seja, acompanhar o crescimento bacteriano em meio sólido, foram semeadas $100 \mu\text{L}$ das diluições 10^{-4} e 10^{-5} em placas de petri com ágar *Macconkey*, sendo cada diluição com três repetições e incubadas a 37°C por 24 horas, de acordo com o procedimento de Czamanski (2003).

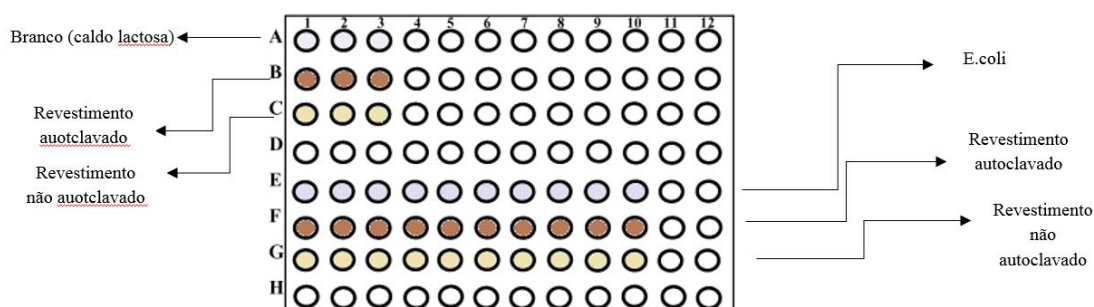
Foram preparadas ainda 2 baterias com 3 microtubos como sendo os tratamentos-controle. Foram adicionados a cada bateria $4,5 \mu\text{L}$ de caldo lactose e $4,5 \mu\text{L}$ das soluções das coberturas autoclavadas e uma outra não autoclavadas, ambas incubadas a 37°C por 24 horas. Após o período de 24 horas foram semeados $100 \mu\text{L}$ em placas de petri com ágar *Macconkey* e ágar nutriente, e incubados a 37°C por 24 horas.

4.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos revestimentos foi determinada através das leituras de absorbância em um leitor ELISA (EZ Read 400), em filtros de 595 nm em intervalos de 24 e 48 horas. Inicialmente, 3 fileiras da microplaca de 96 poços foram separadas como os controles (fileiras A, B e C), onde apenas 3 poços de cada foram preenchidos. A fileira A foi utilizada como branco, onde foram adicionados $200 \mu\text{L}$ de caldo lactose. As fileiras B e C, foram preenchidas com $200 \mu\text{L}$ com das soluções dos revestimentos autoclavado e não-autoclavado, respectivamente.

Posteriormente, foram utilizadas as fileiras E, F e G para os estudos de inoculação da bactéria, onde foram preenchidos 10 poços em cada uma dessas fileiras. Cada um dos poços foi preenchido com as diluições logarítmicas seriadas, variando-se de 10^{-1} a 10^{-10} . Na fileira E, os poços foram preenchidos com a bactéria *E. coli*. Nas fileiras F e G o preenchimento foi feito com 200 μL das diluições dos revestimentos autoclavado e não-autoclavado, respectivamente. Então, foram feitas as leituras das microplacas em um filtro de 595 nm no leitor ELISA (EZ Read 400). Em seguida as microplacas foram incubadas a 37°C até 48 horas, sendo realizada nova bateria de leituras (ROZZATO, 2012). Uma representação esquemática da configuração da placa das análises de ELISA está apresentada na Figura 10.

Figura 10 – Esquema da avaliação ELISA.



A partir da leitura espectrofotométrica foi determinado o potencial de inibição de cada amostra testada para a bactéria *Escherichia coli* BETA LACTAMASE NEWP 0018, em diferentes concentrações da bactéria em estudo de acordo com a Equação 3. Este resultado, portanto, representa a porcentagem de células microbianas que a substância testada foi capaz de inibir (ROZZATO, 2012).

$$\% = \left(1 - \frac{A_c}{A_0}\right) \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

A_c = média das absorbâncias dos revestimentos

A_0 = média das absorbâncias da bactéria

4.5 Análises estatísticas

Todas as análises foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos como médias das três repetições. Os dados foram avaliados através da estatística descritiva (média \pm desvio padrão), inferencial (ANOVA), teste de normalidade e teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando o software SPSS.

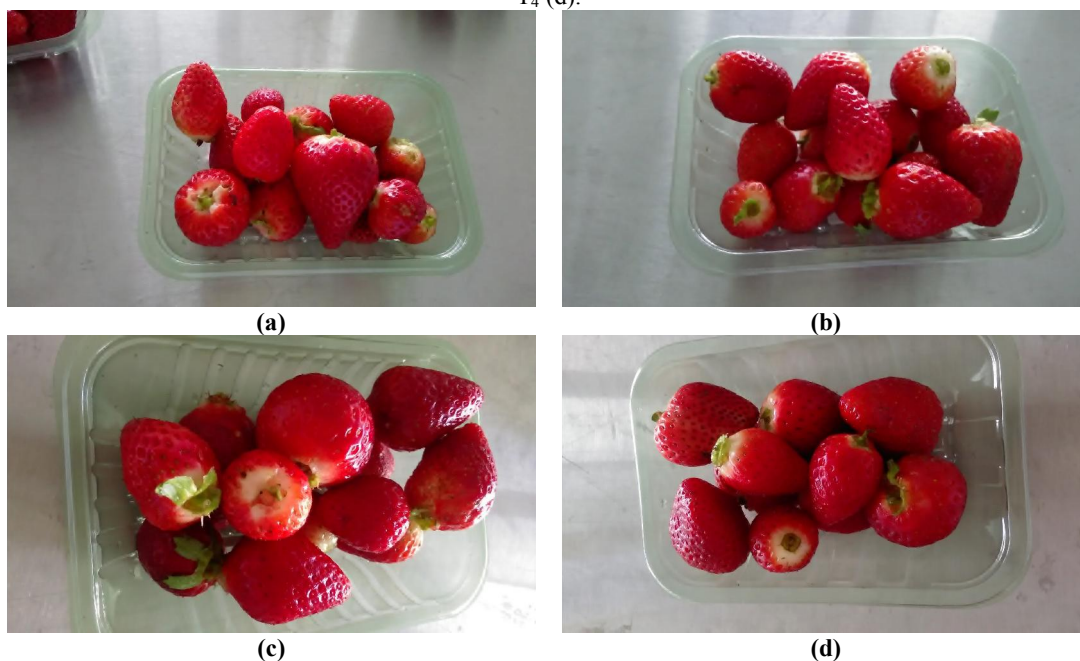
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises físicas e físico-químicas

5.1.1 Cor

Todos os revestimentos aplicados mostraram, de uma forma geral, boa aderência aos frutos. Os revestimentos T₃ e T₄ proporcionaram aos frutos um brilho mais intenso em relação aos tratamentos T₁ e T₂ (Figura 11), o que é um aspecto positivo no que diz respeito à atratividade para comercialização.

Figura 11 – Morangos com revestimentos tratamento T₁ (a), tratamento T₂ (b), tratamento T₃ (c) e tratamento T₄ (d).

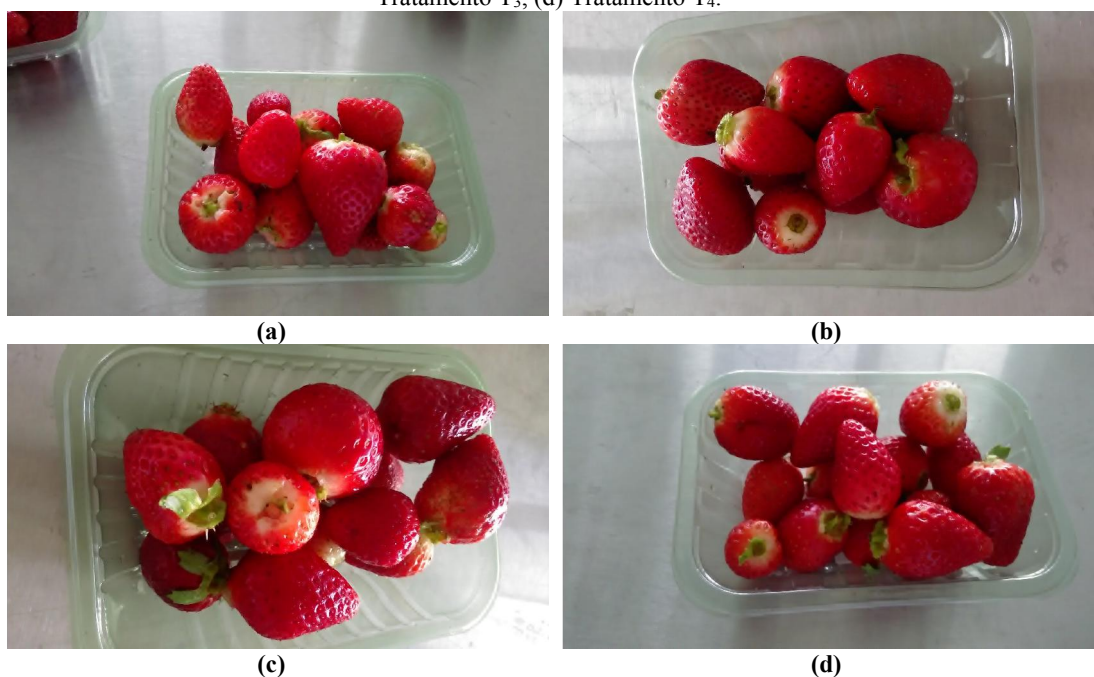


A aparência de frutas e hortaliças é um fator bastante atrativo ao consumidor, frutos de cor fortes e brilhantes, são os mais preferidos. Os frutos tendem a sofrer o escurecimento

enzimático pós-colheita, que consiste em diversas reações provenientes da oxidação enzimática de compostos fenólicos pela ação de polifenoloxidasas (PPO). A principal consequência é a formação de melaninas, pigmentos escuros que prejudicam a aceitação de muitas frutas (AZEREDO, 2003).

A partir da escala descrita no item 4.3.1, e através do uso do banco de dados fotográficos de imagens obtidas em cada um dos dias avaliados foi possível inferir que a aplicação dos revestimentos nos morangos interferiu na cor dos frutos durante o período de armazenamento, conforme demonstrado nas Figuras 12 a 15. De acordo com as análises estatísticas, os resultados da escala subjetiva de cor não apresentaram diferença significativas entre os tratamentos conforme segue demonstrado na Tabela 3.

Figura 12 – Coloração dos morangos no 1º dia de armazenamento. (a) Controle T₁, (b) tratamento T₂, (c) Tratamento T₃, (d) Tratamento T₄.



As Figuras 12, 13, 14 e 15 demonstram a evolução de cor dos morangos ao longo do período de armazenamento. No 1º dia de armazenamento os frutos não apresentaram grandes variações de cor entre os tratamentos (T₁, T₂, T₃ e T₄) conforme observado na Figura 16, e conforme os dados estatísticos descritos na Tabela 3. Contudo, a partir do 5º dia de armazenamento houve uma alteração significativa na coloração, especialmente nos tratamentos controle (T₁) e tratamento T₂, os quais apresentaram um maior escurecimento dos frutos (Figuras 13, 14 e 15).

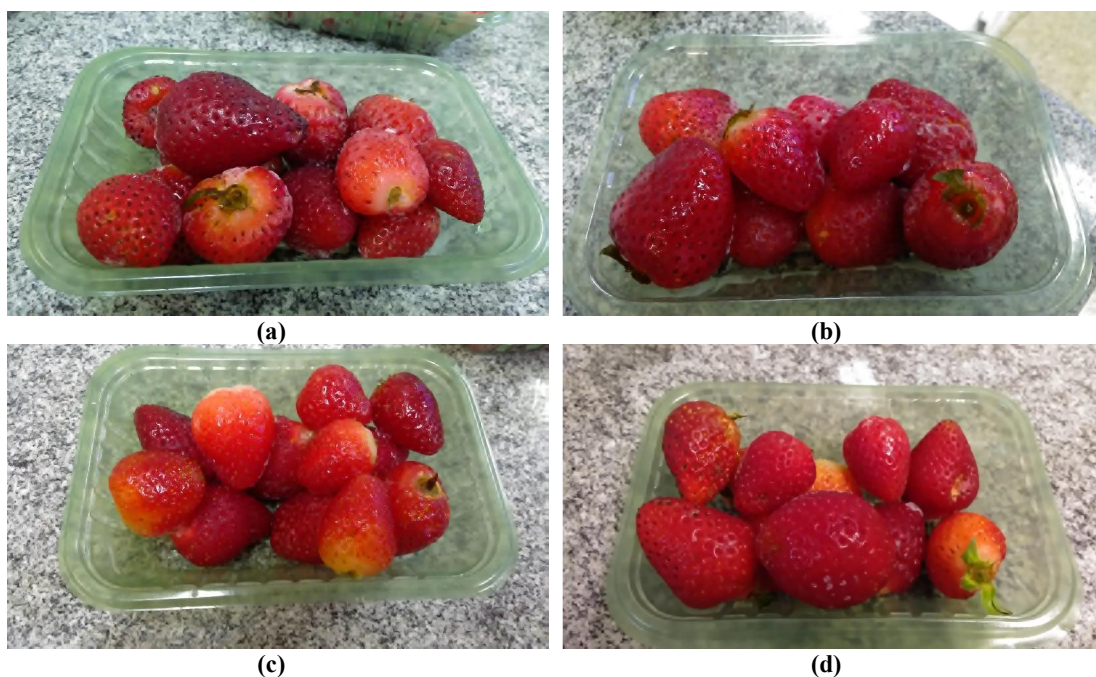
Tabela 3 – Cor dos morangos durante o período de armazenamento.

Tratamento	Período de armazenamento (dias)			
	1	5	9	13
T1	1,33±0,5a	3,0± 0,8a	3,33±0,5ab	3,67±0,5b
T2	1,33±0,5a	2,67±0,9a	3,33±0,5a	3,67±0,5b
T3	1,67±0,5a	2,33±0,5ac	3,0±0,8a	3,33±0,5 ^a
T4	1,67±0,5a	2,0±0,8ac	2,67±0,5a	3,0±0,8 ^a

*Médias de uma mesma coluna seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey com $p \leq 0,05$.

* Médias de uma mesma linha seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey com $p \leq 0,05$.

Figura 13 – Coloração dos morangos no 5º dia de armazenamento. (a) Controle T₁, (b) tratamento T₂, (c) Tratamento T₃, (d) Tratamento T₄.



O tratamento T₄ foi o que apresentou uma menor variação de coloração dos frutos ao longo do período do armazenamento, demonstrando que o revestimento foi bastante efetivo no controle da cor dos morangos. Estes resultados corroboram com o encontrado por Henrique e Cereda (1999), que verificaram que uso de revestimentos de fécula reteve a coloração de morangos por mais tempo, proporcionando maior qualidade na vida pós-colheita.

Figura 14 – Coloração dos morangos no 9º dia de armazenamento. (a) Controle T₁, (b) tratamento T₂, (c) Tratamento T₃, (d) Tratamento T₄.

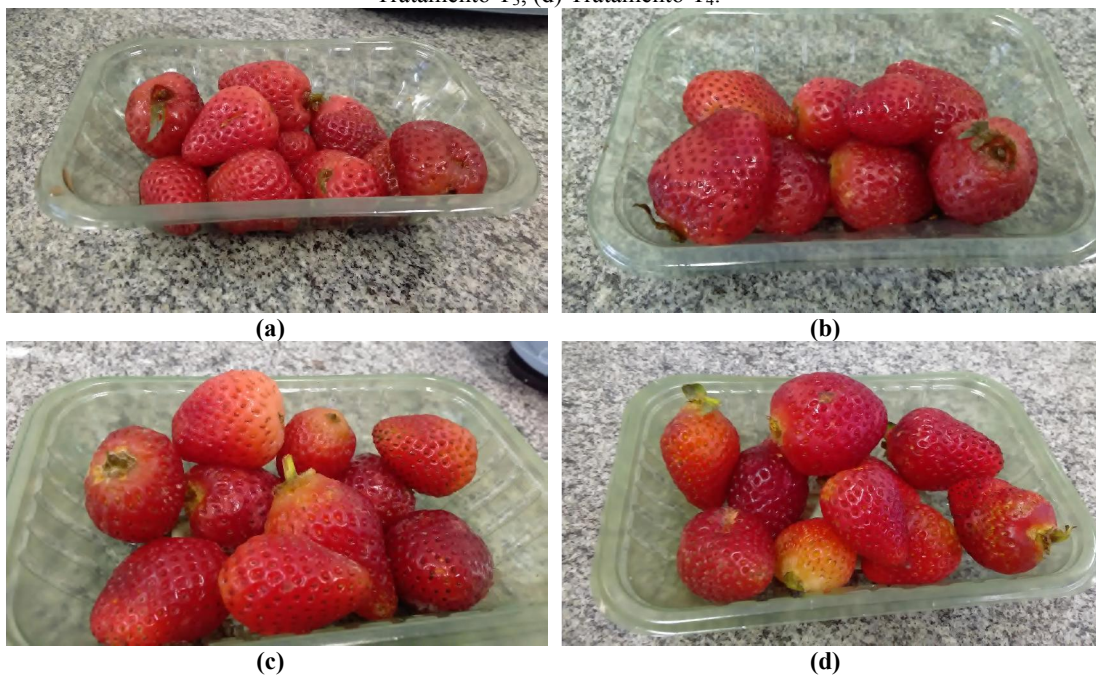
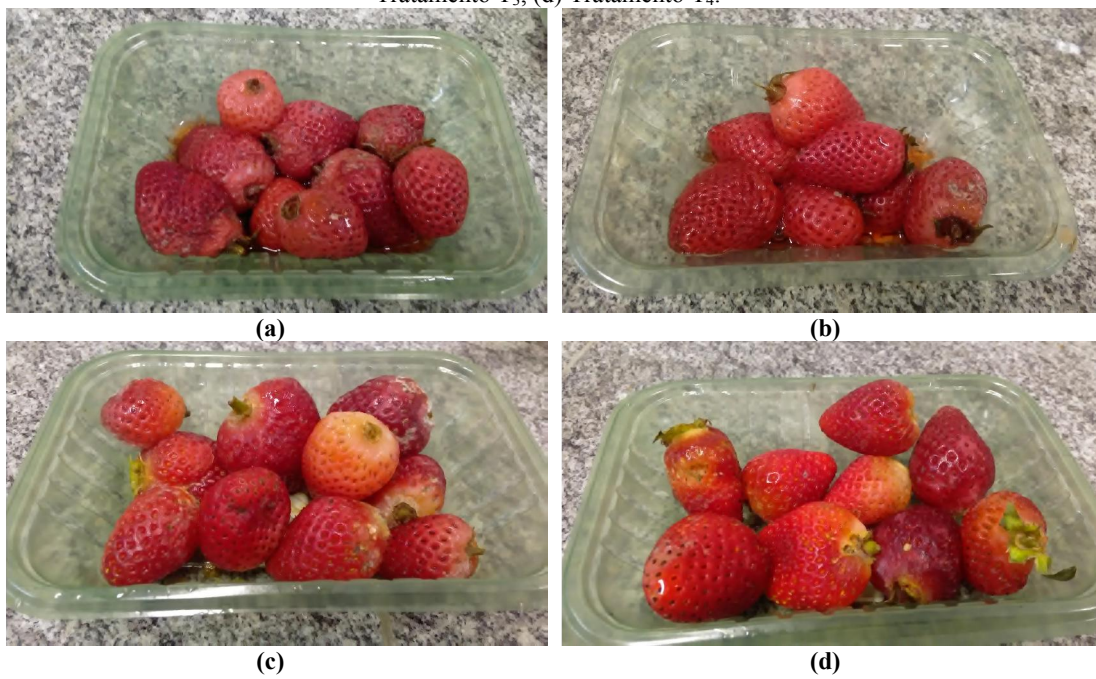
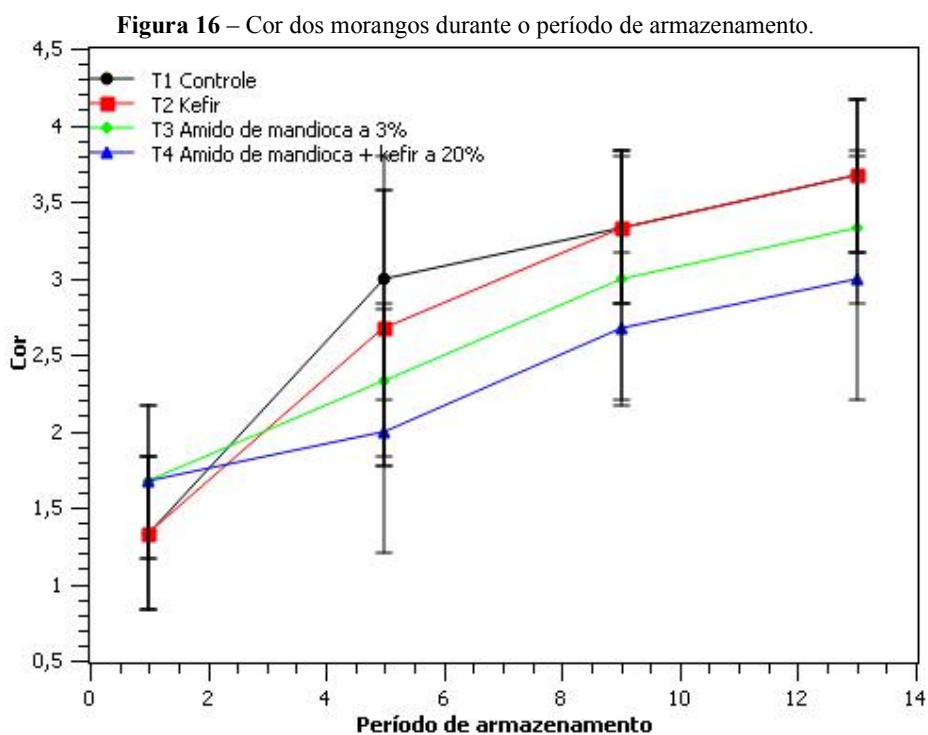


Figura 15 – Coloração dos morangos no 13º dia de armazenamento. (a) Controle T₁, (b) tratamento T₂, (c) Tratamento T₃, (d) Tratamento T₄.



Segundo Azeredo (2003), a utilização de revestimentos comestíveis pode ser útil para reduzir as taxas de escurecimento de frutos. Além da redução das taxas de escurecimento enzimático, outros efeitos importantes são obtidos na aparência de frutas processadas. O brilho e melhor integridade estrutural conferidos pelas películas comestíveis tornam os produtos mais atraentes para o consumidor.



5.1.2 Perda de massa

Os valores para perda de massa apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os valores das médias do tratamento T₄ em relação aos tratamentos T₁, T₂, T₃, durante o período de armazenamento entre o 9º e 13º dia (Tabela 4, Figura 17). De acordo com a Figura 17, é possível observar que durante o período de armazenamento houve um aumento crescente de perda de massa dos frutos para todos os tratamentos, sendo observada uma maior perda de massa no 9º e no 13º dia de armazenamento.

Tabela 4 – Perda de massa (%) dos morangos durante o período de armazenamento.

Tratamento	Período de armazenamento (dias)			
	1	5	9	13
T ₁	0,02±0,005a	4,6± 0,78a	15,6±2,37 ^a	20,3±1,64a
T ₂	0,02±0,005a	3,6±1,39a	12,9±0,69 ^a	19,9±0,45a
T ₃	0,01±0,005a	3,0±0,65a	12,6±0,99a	17,6±1,73c
T ₄	0,01±0,005a	2,7±0,92ac	9,8±0,82bd	13,7±1,67b

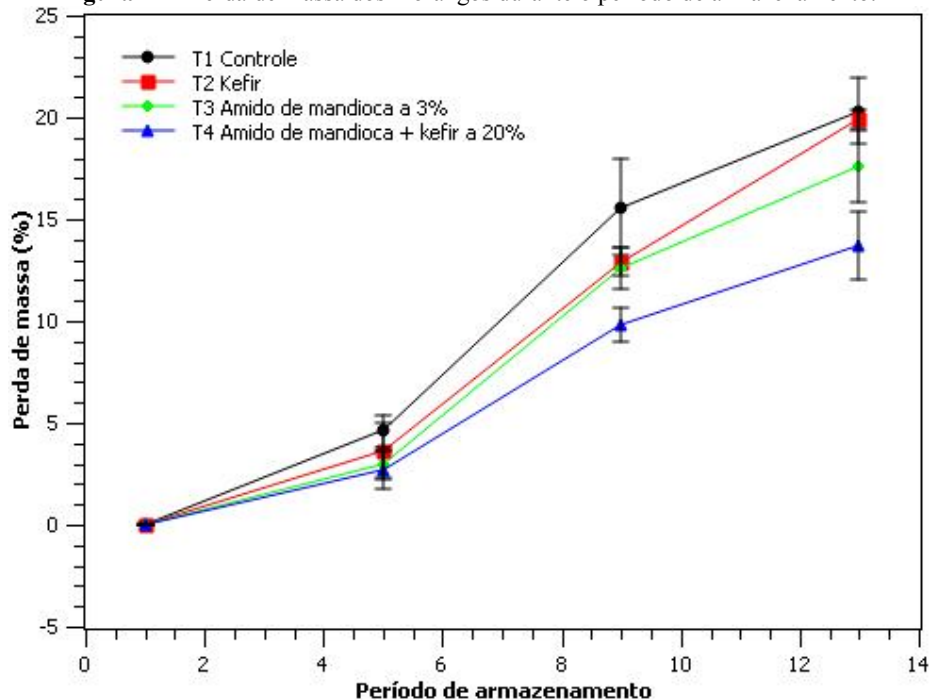
*Médias de uma mesma coluna seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre os tratamentos pelo teste Tukey com $p \leq 0,05$.

* Médias de uma mesma linha seguida da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey com $p \leq 0,05$.

Durante o período de pós-colheita, os frutos e vegetais continuam a respirar, transpirar e produzir hormônio de amadurecimento, alterando, assim, o equilíbrio inicial, o que resulta na alteração das concentrações de CO₂, O₂, H₂O e de C₂H₄ ao longo do período de armazenamento. Com a alta concentração de O₂ e baixa concentração de CO₂, as células internas dos frutos não são mais renovadas, fato que favorece o aumento da respiração e provoca uma queda metabólica (ASSIS, et.al; 2009).

Conforme demonstrado na Figura 17, o controle (T₁) foi o que mais sofreu com o processo de deterioração, apresentando uma maior perda de massa ao longo do período de armazenamento. Foi observada uma variação de 0,02% a 20,3%, entre o 1º dia e o 13º dia de armazenamento, respectivamente. Opostamente, o tratamento T₄ foi o que apresentou a menor perda de massa durante o período de armazenamento variando entre 0,01% e 13,7% entre o 1º dia e o 13º dia de armazenamento, respectivamente (Tabela 4). Resultados semelhantes foram obtidos por Henrique e Cereda (1999), que armazenaram morangos durante 10 dias em condição ambiente, e conseguiram demonstrar que o uso de revestimentos de fécula de mandioca possibilitou diminuir a perda de massa e aumentando em até 5 vezes a vida prateleira de morangos.

Figura 17 – Perda de massa dos morangos durante o período de armazenamento.



Conforme discutido acima, os revestimentos comestíveis promoveram uma menor deterioração dos morangos em relação ao controle (T₁). Segundo Vicentini (2003), o revestimento deve agir como uma barreira externa reduzindo a perda de umidade e a velocidade de respiração, através do controle da atividade respiratória (O₂ e CO₂) do fruto, com isso aumentando a vida de prateleira do fruto.

5.1.3 pH

O pH é um parâmetro responsável por medir a acidez de frutas e alimentos, e seu aumento está diretamente relacionado a uma diminuição na acidez ocorrida durante a maturação das frutas (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Os valores médios de pH dos morangos de cada tratamento não diferiram significativamente entre si entre o 1º e o 9º dia de armazenamento, já no 13º dia os valores de pH apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Média de pH dos morangos durante o período de armazenamento.

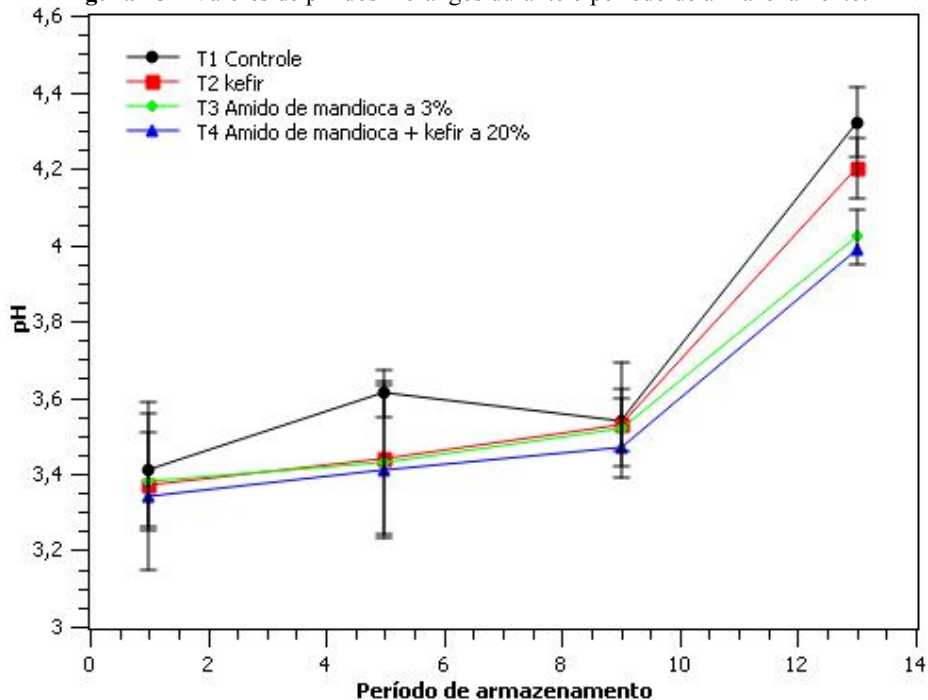
Tratamento	Período de armazenamento (dias)			
	1	5	9	13
T1	3,41±0,15b	3,61± 0,06b	3,54±0,15b	4,32±0,09b
T2	3,37±0,22b	3,44±0,20b	3,53±0,07b	4,20±0,08c
T3	3,38±0,13b	3,43±0,20b	3,52±0,10b	4,02±0,07d
T4	3,34±0,15b	3,41±0,02b	3,47±0,11b	3,99±0,09db

*Médias de uma mesma coluna seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey com $p \leq 0,05$.

* Médias de uma mesma linha com mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey com $p \leq 0,05$.

De acordo com a Figura 18, pôde-se observar um aumento nos valores de pH para todos os tratamentos durante o tempo de armazenamento, o que pode ser explicado pelo maior nível de maturidade dos frutos (Figura 15d) o que ocasiona, conseqüentemente, uma diminuição de acidez. Os morangos que receberam películas T₄, apresentaram menores elevações de pH ao longo do armazenamento, comprovando que este revestimento afetou a maturação no que se refere a degradação destes ácidos. Santos e colaboradores (2011), ao estudarem a aplicação de revestimentos de fécula de mandioca e cera de carnaúba 50% na conservação pós-colheita de mangas ‘Tommy Atkins’, observaram um aumento de pH com esta película, tendo os autores observado uma menor elevação de pH no final do período de armazenamento para os frutos submetidos ao tratamento hidrotérmico + fécula a 2%.

Figura 18 – Valores de pH dos morangos durante o período de armazenamento.



5.1.4 Acidez Total Titulável

O pH e a acidez titulável são usados para determinações de ácidos presentes em alimentos. A diferença entre ambos, é que o pH expressa apenas o ácido dissociado, que tem a capacidade tamponante, já acidez titulável quantifica o total de ácidos presentes (ácidos orgânicos livres, na forma de sais e compostos fenólicos) (GARCIA, 2009). Os resultados obtidos de acidez titulável a partir 5º dia até o final do armazenamento (Tabela 6), apresentaram alteração estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Tabela 6 – Acidez titulável dos morangos durante o período de armazenamento.

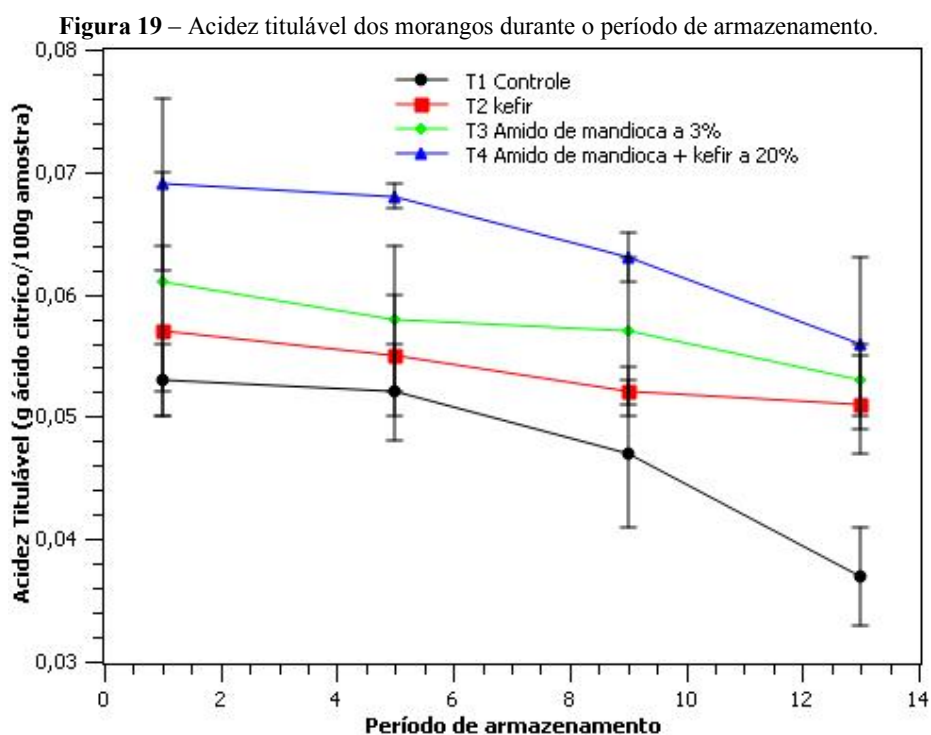
Tratamento	Período de armazenamento (dias)			
	1	5	9	13
T1	0,053±0,003a	0,052±0,004a	0,047±0,006a	0,037±0,004d
T2	0,057±0,007a	0,055±0,005a	0,052±0,002a	0,051±0,004a
T3	0,061±0,009a	0,058±0,006ab	0,057±0,006ac	0,053±0,003a
T4	0,069±0,007a	0,068±0,001ab	0,063±0,002ac	0,056±0,007a

*Médias de uma mesma coluna seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey com ($p \leq 0,05$).

*Médias de uma mesma linha seguida da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey com $p \leq 0,05$.

A acidez total titulável em produtos hortícolas visa mensurar, principalmente, os ácidos orgânicos que estão dissolvidos nos vacúolos das células, tanto na forma livre como combinada com sais, ésteres, glicosídeos. Os ácidos orgânicos mais abundantes em frutas são o cítrico e málicos, e o teor desses ácidos diminui com o aumento da maturação dos frutos, devido ao seu uso como substrato no processo respiratório ou de sua conversão em açúcares (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Os teores de acidez dos morangos decresceram durante os dias de armazenamento, indicando um avanço de maturação dos frutos (Figura 19). Os morangos que receberam os revestimentos T₂, T₃ e T₄ apresentaram maiores valores de acidez, que o controle (T₁) durante o período de armazenamento, fato que pode ser explicado pelas mesmas razões do pH já mencionadas. Segundo Chitarra e Chitarra (2005), o teor de ácidos orgânicos, tende a diminuir com a maturação dos frutos, em decorrência do seu uso como substrato no processo respiratório ou de sua conversão em açúcares. Os ácidos orgânicos são importantes componentes do sabor e aroma das frutas, tendo influência direta sob os mesmos.



5.1.5 Sólidos solúveis totais

O teor de sólidos solúveis totais (SST) é empregado como um parâmetro para medir o teor de açúcares, e geralmente aumenta com o amadurecimento das frutas por meio das biossínteses ou pela degradação de polissacarídeos (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Os teores de sólidos solúveis totais apresentaram diferença significativa entre os tratamentos a partir do 5º dia até o 13º dia de armazenamento (Tabela 7).

Tabela 7 – Teores de sólidos solúveis totais (° Brix), de morangos durante o período de armazenamento.

Tratamento	Período de armazenamento (dias)			
	1	5	9	13
T1	8,2±0,5a	7,8± 0,8a	7,5±0,9a	6,6±0,7 ^a
T2	8,1±0,6ab	7,6±0,7ab	7,4±0,7ab	6,5±0,6ab
T3	8,0±0,4ac	7,5±0,6ac	7,3±0,5ac	6,1±0,2c
T4	7,9±0,4b	6,8±0,2b	6,5±0,9b	5,9±0,4b

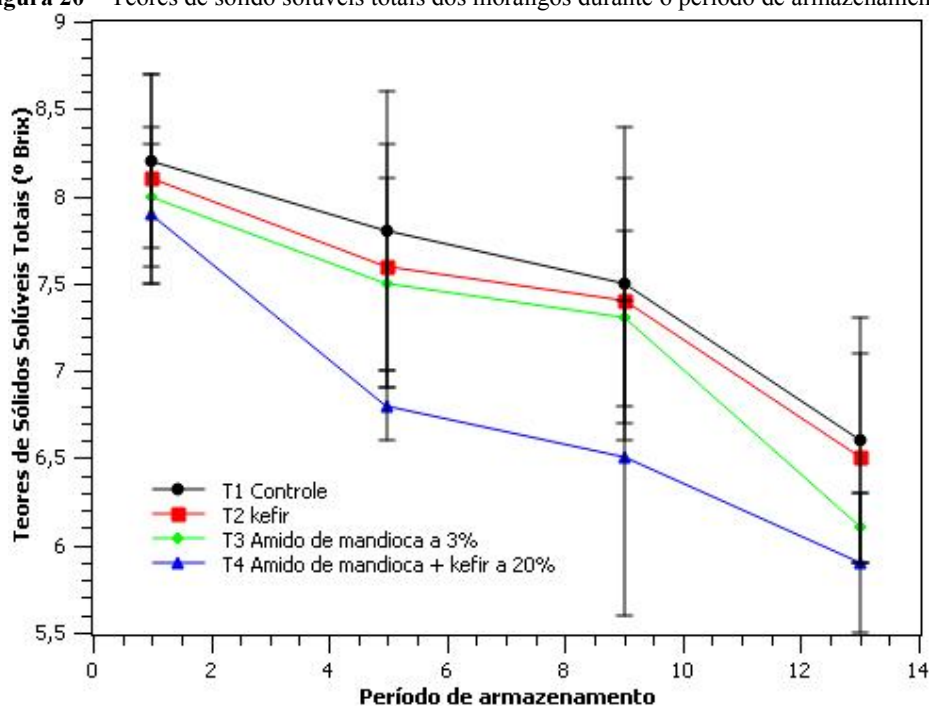
*Médias de uma mesma coluna seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey com ($p \leq 0,05$).

*Médias de uma mesma linha seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey com ($p \leq 0,05$).

Além disso, os teores de SST dos frutos apresentaram uma redução ao longo do armazenamento para todos os tratamentos (Figura 20). Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira e colaboradores (2013), onde foi observado que os teores de SST de amoras recobertas com revestimentos de fécula de mandioca e kefir de água a 20%, e revestimento de fécula de mandioca a 2,5% apresentaram uma redução no período final do armazenamento. Segundo Garcia (2009), a diminuição de valor de SST ao longo do armazenamento, é uma característica de frutos não-climatéricos, como o morango. Isso acontece pelo fato de que na pós-colheita estes frutos apresentam pouca ou nenhuma reserva energética (amido), o que torna necessário a utilização dos açúcares presentes na fruta como fonte energética para a respiração, reduzindo assim o teor de SST.

Os morangos que receberam o tratamento T₄, apresentaram os menores teores de SST em comparação aos outros tratamentos (T₁, T₂ e T₃), o que significa que o revestimento promoveu a inibição da ação do processo respiratório resultante do acúmulo de CO₂ e a diminuição de O₂ no interior da embalagem.

Figura 20 – Teores de sólido solúveis totais dos morangos durante o período de armazenamento.



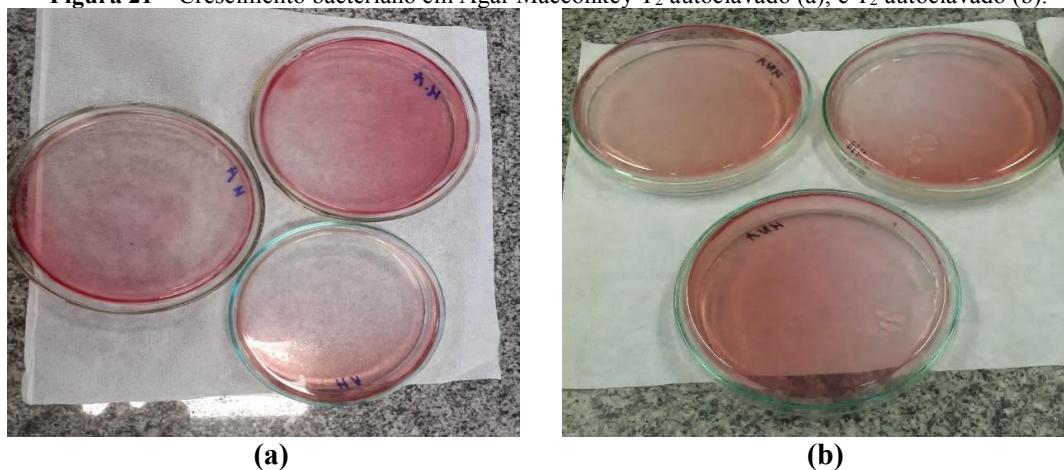
5.2 Análises microbiológicas

5.2.1 Revestimento de kefir (T₂)

A presença de bactérias Gram-negativa no tratamento T₂, foi avaliada pela semeadura dos controles em *Ágar Macconkey* (AM), que é um meio cultura seletivo diferencial que favorece o crescimento de bactéria Gram-negativa. Os meios de cultura seletivo e diferencial são utilizados para impedir o crescimento de bactérias indesejáveis e favorecer o crescimento do microrganismo de interesse, além de facilitar a diferença entre as colônias de um microrganismo crescendo na mesma placa (TORTORA *et.al.*, 2017).

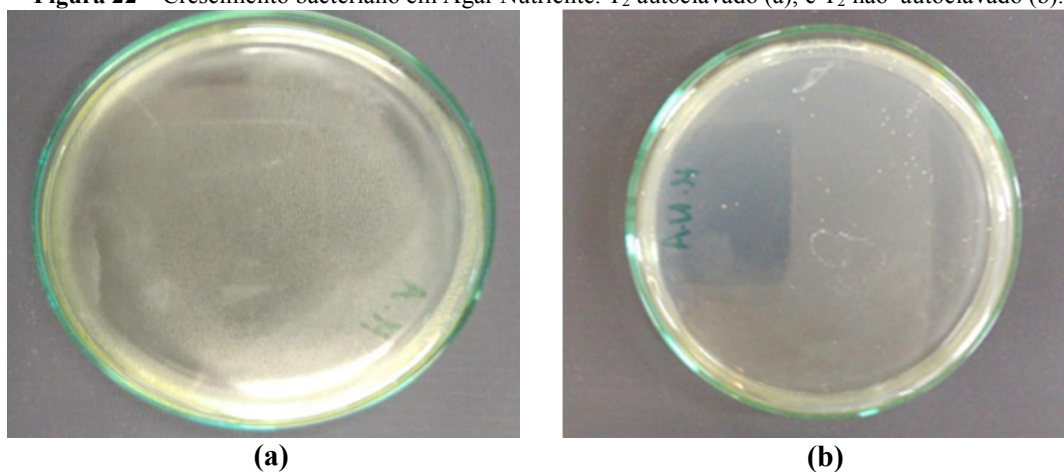
O crescimento bacteriano dos controles da cobertura de kefir (kefir autoclavado e não autoclavado), foram avaliados a partir da semeadura de 100 μ L em *Ágar Nutriente* (AN) e *Ágar Macconkey* (AM). A presença (ou ausência) de bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*) no soro de kefir foi avaliada pela semeadura de 100 μ L dos controles (kefir autoclavado e kefir não autoclavado) em *Ágar Macconkey* (AM). De acordo com as placas de petri apresentadas na Figura 21, não houve crescimento bacteriano, o que significa que os microrganismos presentes no kefir não fazem parte do grupo de bactérias gram-negativas.

Figura 21 – Crescimento bacteriano em Agar Macconkey T₂ autoclavado (a), e T₂ autoclavado (b).



Com relação ao crescimento de outras bactérias presentes no revestimento de kefir, verificou-se, a partir da semeadura da cobertura de kefir (T₂) em Ágar Nutriente, que na condição do soro de kefir autoclavado não houve crescimento bacteriano (Figura 22). Já na condição não autoclavado, foi possível observar a presença de algumas colônias de bactéria, indicando a presença destes microrganismos no soro de kefir. Neste trabalho não foram realizados estudos de identificação dos tipos de bactérias, entretanto, pode-se cogitar esta informação a partir dos estudos realizados por Miguel (2009), onde foram identificadas bactérias nos grãos de kefir de água dos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Gluconacetobacter*, *Acetobacter*.

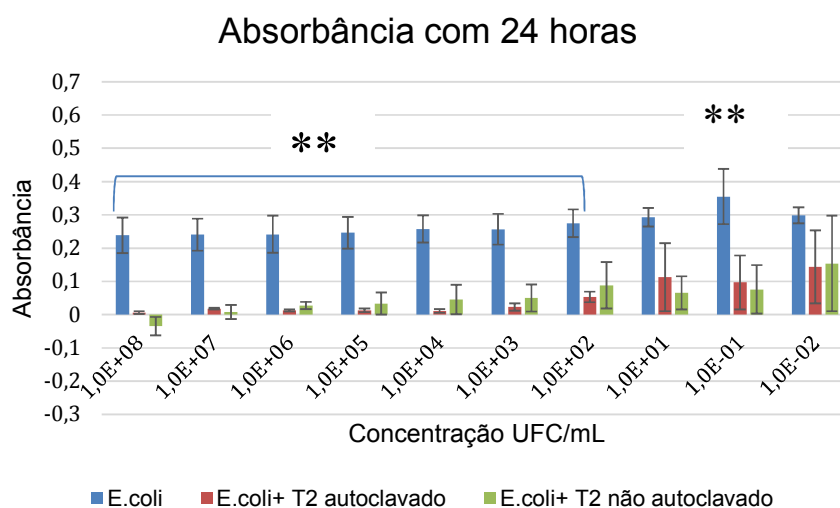
Figura 22 – Crescimento bacteriano em Agar Nutriente. T₂ autoclavado (a), e T₂ não-autoclavado (b).



O crescimento bacteriano em meio líquido (caldo de lactose), foi verificado através dos valores de absorvância das amostras entre 24 e 48 horas. Segundo Cunha e Vieira (2014), a absorvância está diretamente relacionada ao crescimento dos microrganismos presentes no meio, pois a medida que o meio vai se tornando mais turvo maior será o valor de absorvância, indicando um aumento no número de bactérias presente no meio.

Neste trabalho, ficou demonstrado que não houve grandes alterações de crescimento de *E. coli* entre as concentrações avaliadas durante o período de 24 horas. Isto pode ser verificado através das informações disponíveis na Figura 23, o que significa que a colônia provavelmente já estava em sua fase estacionária. De acordo com Tortora e coautores (2017), na fase estacionária do crescimento bacteriano é estabelecido um equilíbrio entre a morte microbiana e a produção de novas células, ou seja, a velocidade de reprodução diminui, tornando o número de morte microbianas equivalente ao número de células novas, com isso a população microbiana se estabiliza.

Figura 23 – Crescimento bacteriano (*E. coli*.) após 24 horas.



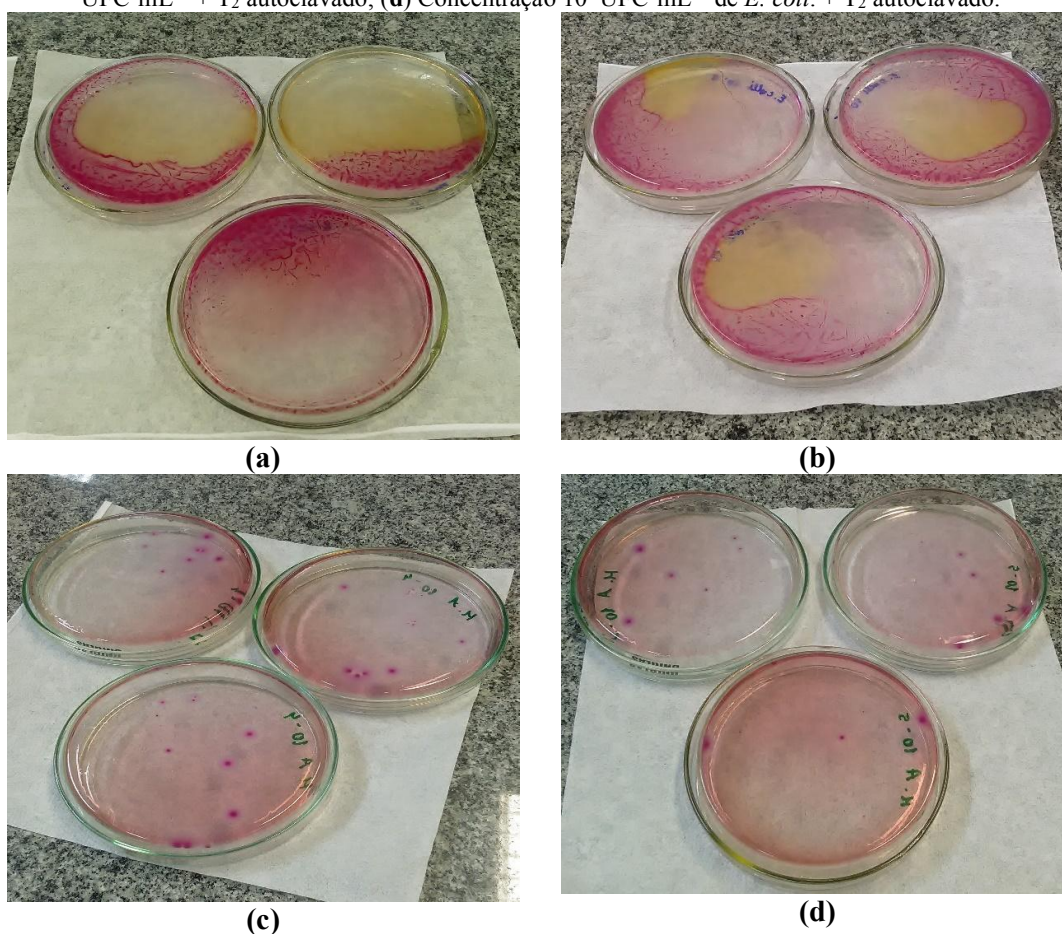
** Apresentaram diferença significativa pelo teste de anova $p \leq 0,05$ apenas para *E. coli* em relação ao T₂ autoclavado e T₂ não autoclavado.

As coberturas de kefir (T₂), tanto no modo autoclavado quanto no modo não autoclavado, interferiram significativamente no crescimento da *E. coli*. O crescimento foi fortemente inibido, sendo este efeito de inibição mais efetivo nas primeiras concentrações ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL a $1,0 \times 10^2$ UFC/mL e na concentração $1,0 \times 10^{-1}$ UFC/mL) tanto para a condição autoclavada como para a condição não autoclavada (Figura 23). De acordo com Santos (2008), as bactérias presentes no kefir são capazes de produzir várias substâncias

antimicrobianas como peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e bacteriocinas, as quais são potentes inibidoras do crescimento de bactérias como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*.

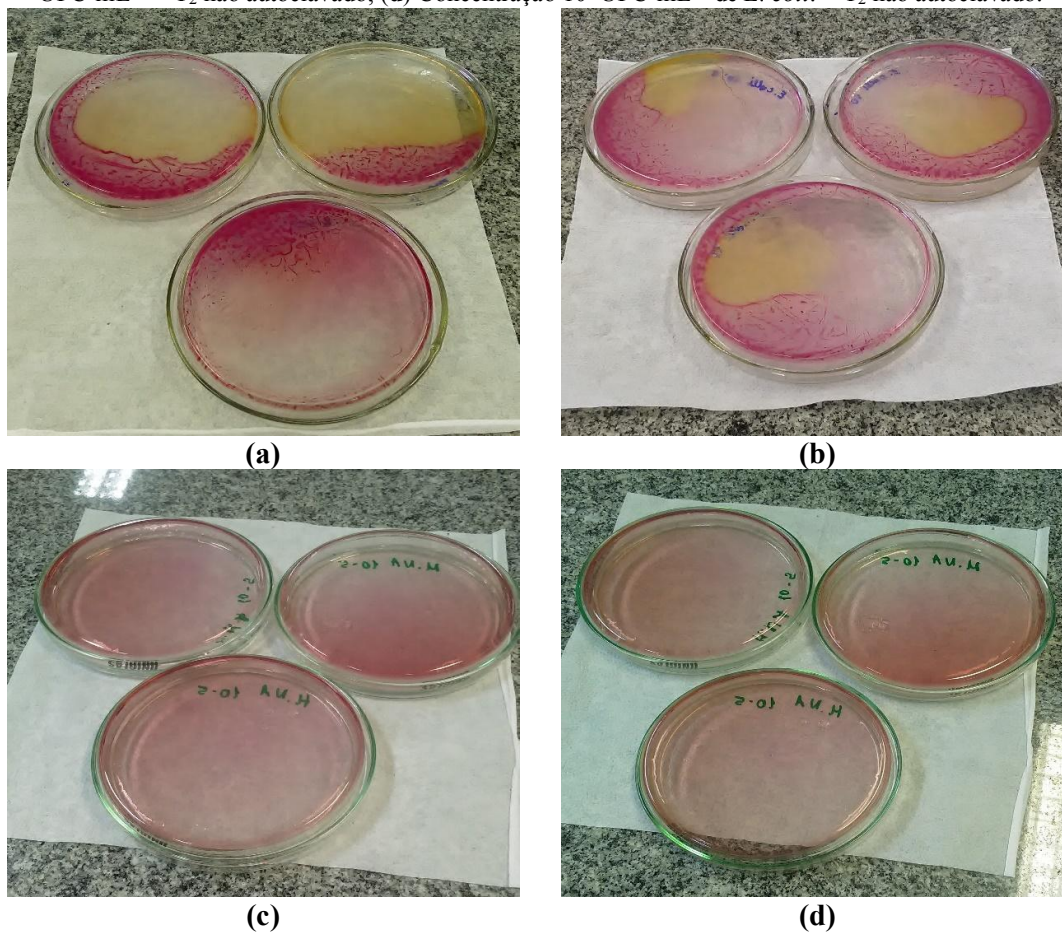
As leituras de absorvância foram combinadas com a semeadura das diluições 10^{-4} e 10^{-5} do inoculo bacteriano em placas de petri com Ágar *Macconkey*, o que correspondeu às respectivas concentrações iguais a $1,0 \cdot 10^5$ e $1,0 \cdot 10^4$ de UFC/mL, para a verificação do crescimento bacteriano em meio sólido. Para o T₂ autoclavado, observou-se que a diluição $1,0 \cdot 10^{-5}$ (que corresponde a uma concentração $1,0 \cdot 10^4$ UFC/mL) proporcionou uma diminuição mais significativa no número de colônia da *E. coli* quando comparado com a diluição $1,0 \cdot 10^{-4}$ (Figura 22). A partir destas observações, concluiu-se que na diluição $1,0 \cdot 10^{-5}$ o efeito inibitório do T₂ frente à *E. coli* foi mais efetivo. A coloração amarela presente nas placas de petri das amostras de *E. coli* (Figuras 24a e 24b) significa uma perda de nutriente do meio de cultura, ou seja, o meio de cultura já não apresenta nutrientes suficiente para o crescimento bacteriano.

Figura 24 – Crescimento bacteriano (*E. coli*) em Ágar *Macconkey* no tempo de 24 horas para T₂. (a) Concentração 10^5 UFC·mL⁻¹ de *E. coli*; (b) Concentração 10^4 UFC·mL⁻¹ de *E. coli*; (c) Concentração 10^5 UFC·mL⁻¹ + T₂ autoclavado; (d) Concentração 10^4 UFC·mL⁻¹ de *E. coli* + T₂ autoclavado.



Para a condição do T₂ não autoclavado observou-se que a inibição do crescimento da *E. coli* foi bastante efetiva nas duas diluições avaliadas ($1,0 \cdot 10^{-4}$ e $1,0 \cdot 10^{-5}$), não sendo observada a presença de colônia de bactéria nas placas de petri (Figura 25). A partir desta observação, foi possível inferir que o soro de kefir não autoclavado inibiu totalmente o crescimento de *E. coli*.

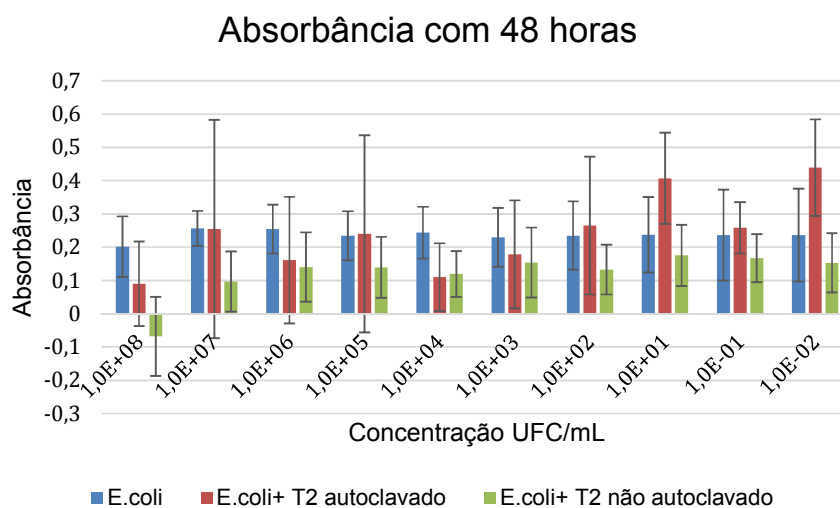
Figura 25 – Crescimento bacteriano (*E. coli*) em Ágar Macconkey no tempo de 24 horas para T₂. (a) Concentração 10^5 UFC·mL⁻¹ de *E. coli*; (b) Concentração 10^4 UFC·mL⁻¹ de *E. coli*; (c) Concentração 10^5 UFC·mL⁻¹ + T₂ não autoclavado; (d) Concentração 10^4 UFC·mL⁻¹ de *E. coli* + T₂ não autoclavado.



Com 48 horas de incubação, o crescimento da *E. coli* foi menor em comparação aos resultados observados para um período de 24 horas. Com isto, provavelmente a bactéria já se encontrava na fase de morte, após decorridas 48 horas de incubação (Figura 26). De acordo com Tortora e colaboradores (2017), à medida que as condições do meio vão se tornando cada vez menos convenientes para a divisão celular, muitas células perdem a capacidade de

se dividir e morrem, ou seja, na fase de morte o número de células vivas de um microrganismo decresce em velocidade logarítmica.

Figura 26 – Crescimento bacteriano (*E. coli.*) após 48 horas.



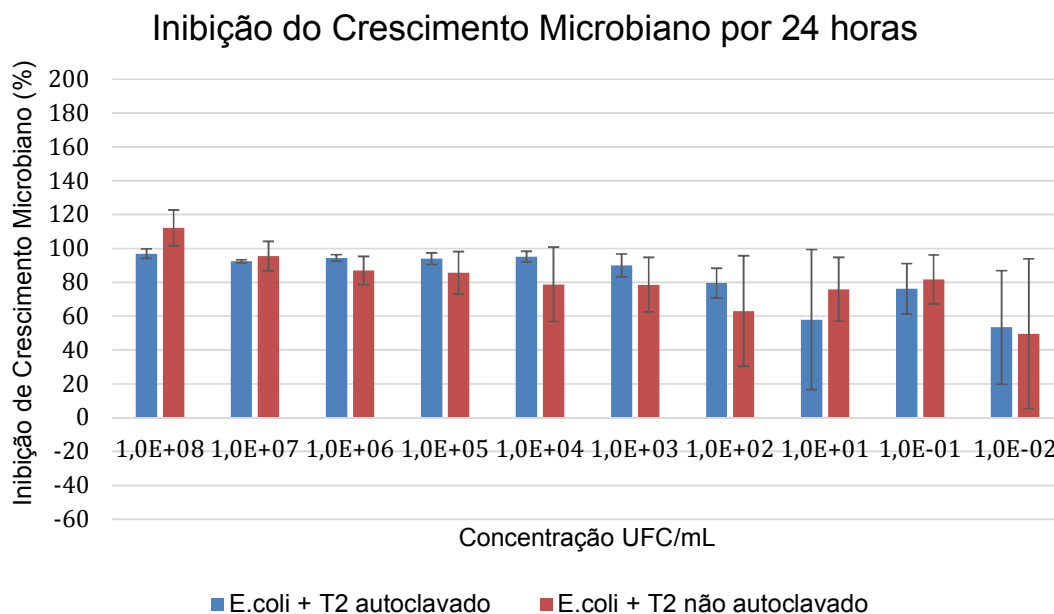
Em relação às amostras de soro de kefir autoclavado e não autoclavado (T₂), a inibição do crescimento de *E. coli* também foi menos eficiente que com um tempo de 24 horas. Foi observado que nas concentrações $1,0 \times 10^1$, $1,0 \times 10^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-2}$ UFC/mL, ocorreu um crescimento bacteriano superior ao da *E. coli*, podendo-se afirmar que nessas concentrações não houve inibição do crescimento de *E. coli*. Os resultados das leituras de absorbância não apresentaram diferença significativa entre as amostras.

De acordo com a Figura 27, o revestimento do soro de kefir (T₂) apresentou inibição frente a *E. coli*, porém estatisticamente não apresentou diferença significativa entre as condições autoclavada e não autoclavada. A concentração $1,0 \times 10^2$ UFC/mL na condição do T₂ não autoclavado não passou pelo teste de normalidade, apresentando um desvio padrão bem grande. Igualmente, a concentração $1,0 \times 10^1$ UFC/mL não passou pelo teste de normalidade nas duas condições do T₂, o que significa que as triplicatas não foram reproduzíveis estatisticamente.

Ainda de acordo com a Figura 27, o revestimento de kefir (T₂) apresentou inibição frente a *E. coli* de quase 100% nas duas condições avaliadas para a maioria das concentrações. As exceções que podemos mencionar são: as concentrações $1,0 \times 10^2$ UFC/mL e $1,0 \times 10^{-2}$ UFC/mL, para a condição não autoclavado; e, as concentrações $1,0 \times 10^1$ UFC/mL e $1,0 \times 10^{-2}$ UFC/mL para condição autoclavado. Ambas apresentaram um

percentual de inibição abaixo de 100%. Resultado semelhante foi encontrado por Weschenfelder (2009), demonstrando que o soro de kefir apresentou total inibição e inativação frente ao patógeno *Escherichia coli* ATCC (11229), em concentrações $\leq 10^8$ UFC/mL.

Figura 27 – Inibição do crescimento bacteriano (%) após 24 horas de incubação.

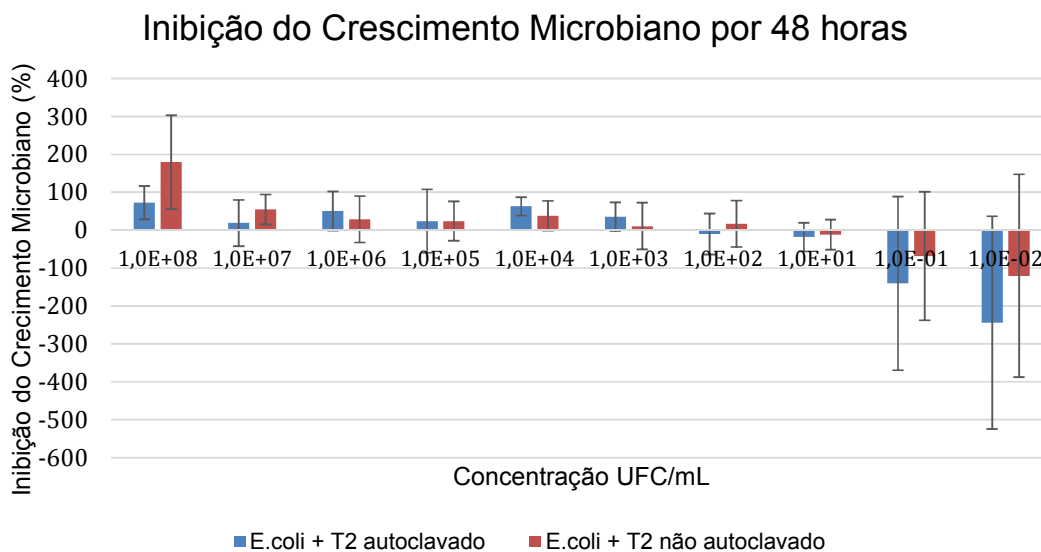


Para o T₂ autoclavado, a inibição pode ser proveniente de alguma substância que foi liberada do soro de kefir durante a autoclave, pois de acordo com as placas de Agar Nutriente no T₂ autoclavado, não existe bactéria presente no meio (Figura 22). Na concentração $1,0 \times 10^8$ UFC/mL o percentual de inibição do T₂ não autoclavado ultrapassou os 100%, o que significa que nessa concentração o T₂ inibiu em 100% o crescimento da *E. coli*. Para os casos em que o crescimento ficou acima de 100%, provavelmente isso é devido ao crescimento de bactérias do kefir (Figura 27).

De acordo com as análises estatísticas, com 48 horas de incubação as condições do T₂ autoclavado e o T₂ não autoclavado também não apresentaram diferença significativa entre si. Além disso as concentrações $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, $1,0 \times 10^{-1}$ UFC/mL e $1,0 \times 10^{-2}$ UFC/mL não passaram pelo teste de Anova, apresentando um desvio padrão bem grande, conforme demonstrado na Figura 28. Em comparação ao tempo de incubação de 24 horas, com 48 horas o percentual de inibição do revestimento de kefir (T₂) foi bem inferior ao tempo

nas duas condições (Figura 28). Isto pode ser atribuído ao baixo efeito de inibição por conta de que as bactérias já estavam na fase de morte com 48 horas.

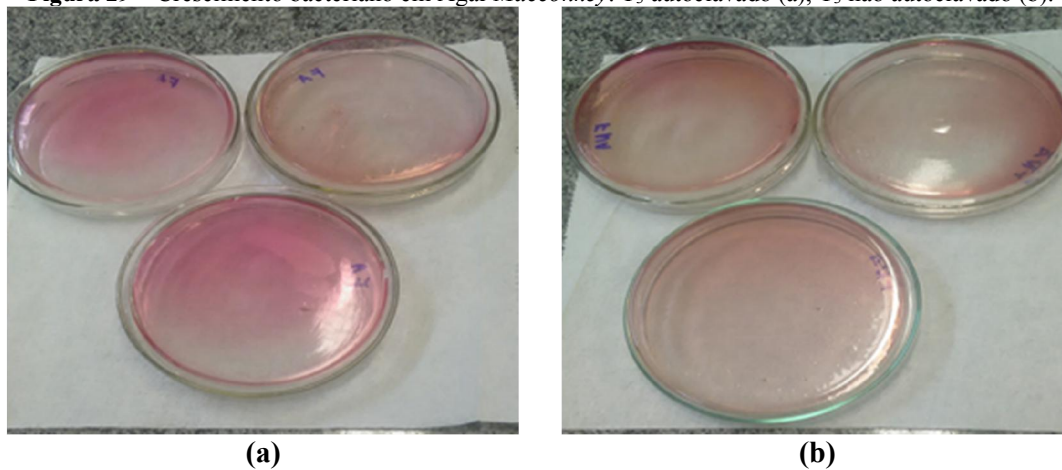
Figura 28 – Inibição do crescimento bacteriano (%) após 48 horas de incubação.



5.2.2 Revestimento de amido de mandioca (T₃)

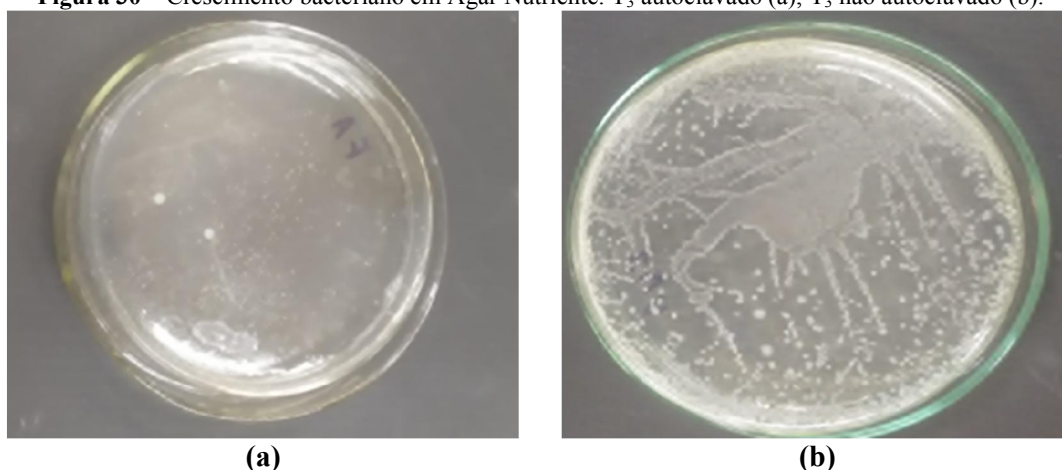
Não se observou nenhum crescimento bacteriano nas placas de petri quando o tratamento T₃ foi empregado, o que significa que no revestimento de amido de mandioca a 3% não há a presença de bactérias pertencentes ao grupo Gram-negativa (Figura 29).

Figura 29 – Crescimento bacteriano em Agar *Macconkey*. T₃ autoclavado (a), T₃ não autoclavado (b).



Um fato inesperado ocorreu para a condição do T₃ autoclavado, onde foi observado crescimento bacteriano. Possivelmente a autoclave não foi eficiente, pois não conseguiu matar todos microrganismos presentes no amido (Figura 30a). Segundo Galvão (2012), para que o processo de esterilização seja um processo absoluto é fundamental conhecer o ciclo de vida das bactérias e as condições necessárias para sua destruição, bem como de seus esporos.

Figura 30 – Crescimento bacteriano em Ágar Nutriente. T₃ autoclavado (a), T₃ não autoclavado (b).



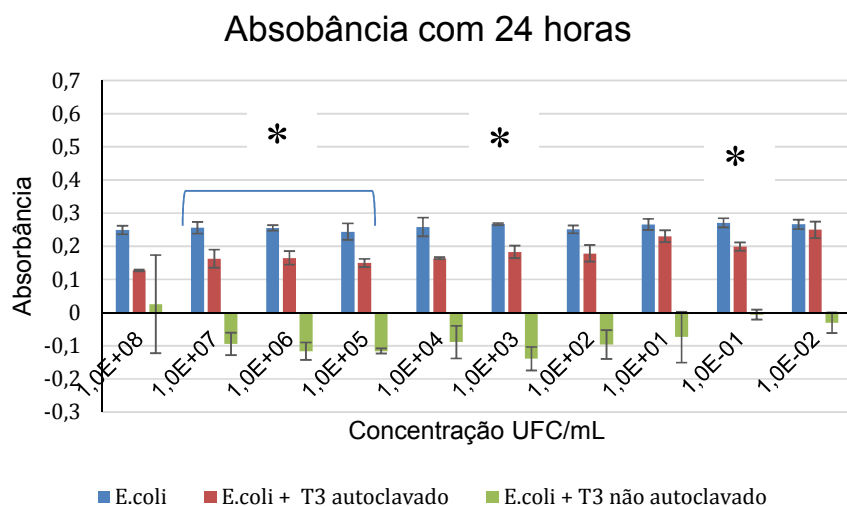
Ainda conforme demonstrado na Figura 30, para a condição do T₃ não autoclavado também foi observado um crescimento bacteriano bastante expressivo. De acordo com estudos realizados por Avancini (2007), a microbiota do amido de mandioca é constituída principalmente de bactérias ácido lácticas como: *Lactococcus lactis ssp lactis*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus plantarum*.

Para o tratamento T₃ houve crescimento da *E. coli* após 24 horas, o qual manteve-se praticamente constante durante este período, não sendo observadas grandes alterações de absorvância entre as concentrações (Figura 31). Em relação a *E. coli* + T₃ autoclavado, observou-se que a solução de amido autoclavado apresentou inibição para o crescimento da *E. coli*, embora bem menos expressiva quando comparada ao tratamento T₂.

Para as amostras de *E. coli* + T₃ não autoclavado, foram observados resultados bem promissores. Os valores de absorvância obtidos ficaram entre 0 e -0,1, o que significa que para condição T₃ não autoclavado não houve crescimento bacteriano (Figura 31). Em outras palavras, as bactérias presentes no amido inibiram fortemente o crescimento de *E. coli*. De acordo com os tratamentos estatísticos, as concentrações $1,0 \times 10^7$ UFC/mL a $1,0 \times 10^5$

UFC/mL, $1,0 \times 10^3$ UFC/mL e $1,0 \times 10^{-1}$ UFC/mL apresentaram diferença significativa entre as amostras avaliadas.

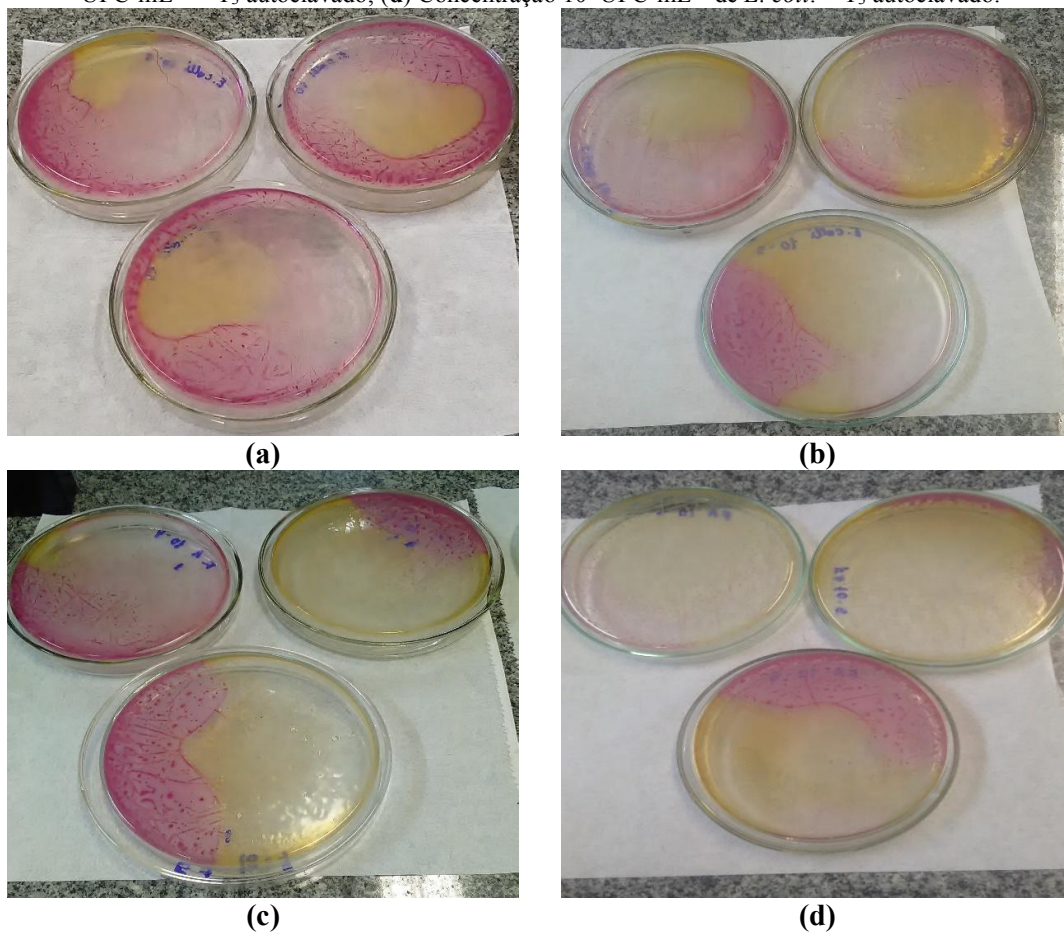
Figura 31 – Crescimento bacteriano após 24 horas para o tratamento T₃.



* Apresentaram diferença significativa pelo teste de Anova $p \leq 0,05$ entre si.

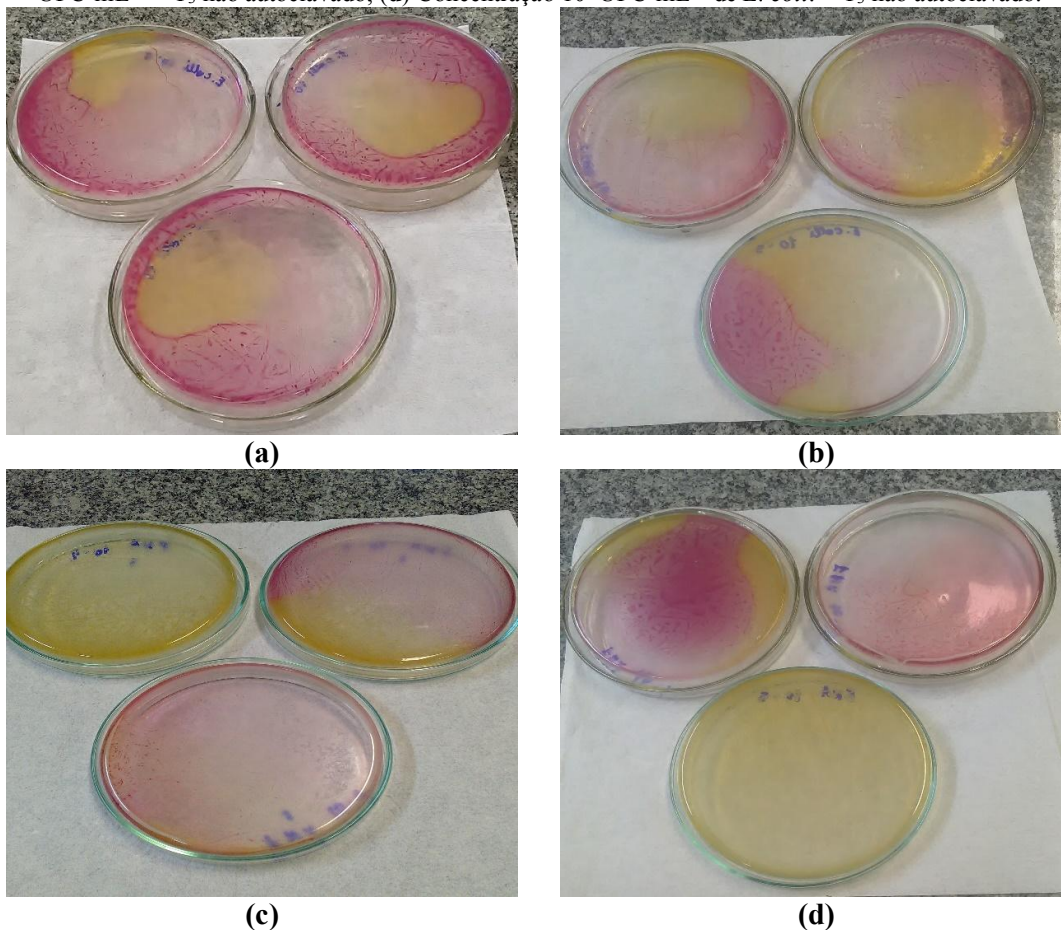
Conforme observa-se na Figura 32d, a concentração 1×10^4 UFC/mL da solução do amido autoclavado inibiu o crescimento da *E. coli* na mesma concentração do inoculo bacteriano de controle (Figura 32a). Já a concentração 1×10^5 UFC/mL, levou à diminuição no número de colônias, porém em um grau menos significativo (Figura 32c).

Figura 32 – Crescimento bacteriano (*E. coli*) em Ágar Macconkey no tempo de 24 horas para T₃. (a) Concentração 10⁵ UFC·mL⁻¹ de *E. coli*; (b) Concentração 10⁴ UFC·mL⁻¹ de *E. coli*; (c) Concentração 10⁵ UFC·mL⁻¹ + T₃ autoclavado; (d) Concentração 10⁴ UFC·mL⁻¹ de *E. coli* + T₃ autoclavado.



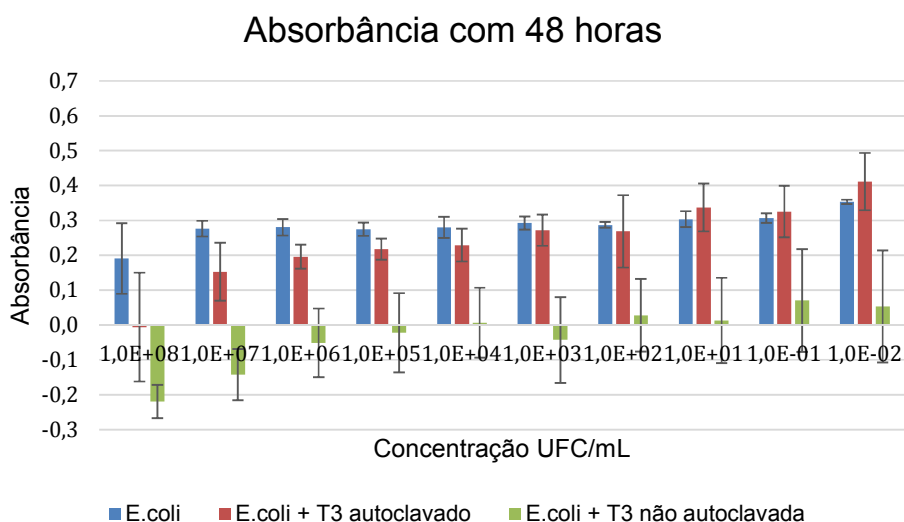
Em relação a condição da solução do amido não autoclavado, observou-se alteração entre as placas da *E. coli* e as placa de *E. coli* + T₃ não autoclavado, o que significa que a solução do amido não autoclavado inibiu o crescimento bacteriano, e cujo melhor resultado observado foi para a concentração 1, 0 x 10⁵ UFC/mL (Figura 33).

Figura 33 – Crescimento bacteriano (*E. coli*) em Ágar Macconkey no tempo de 24 horas para T₃. **(a)** Concentração 10⁵ UFC·mL⁻¹ de *E. coli*; **(b)** Concentração 10⁴ UFC·mL⁻¹ de *E. coli*; **(c)** Concentração 10⁵ UFC·mL⁻¹ + T₃ não autoclavado; **(d)** Concentração 10⁴ UFC·mL⁻¹ de *E. coli*. + T₃ não autoclavado.



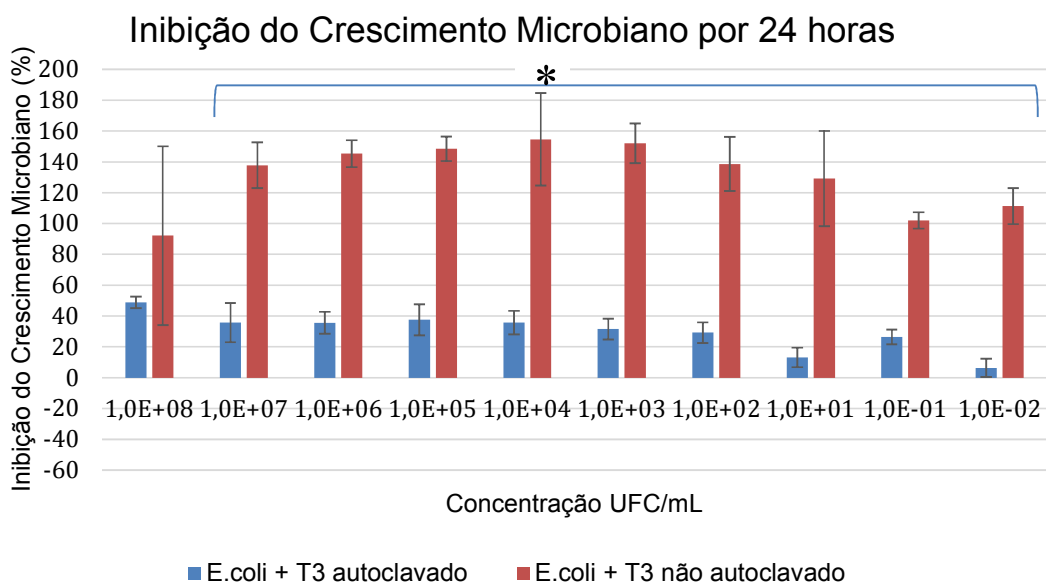
A Figura 34 demonstra o crescimento bacteriano após 48 horas. As amostras de *E. coli*. + T₃ não autoclavado apresentaram valores de absorvância superiores aos do tempo de 24 horas a partir das concentrações 1,0 x 10⁷ UFC/mL a 1,0 x 10⁻² UFC/mL, indicando que após 48 horas de incubação as espécies bacterianas ainda possuíam nutrientes favoráveis ao crescimento das bactérias presentes no meio. A amostra de *E. coli* com adição do T₃ não autoclavado apresentou comportamento semelhante ao tempo de 24 horas, apresentando valores de absorvância próximo de zero, e inibindo totalmente o crescimento da *E. coli*.

Figura 34 – Crescimento bacteriano após 48 horas.



De acordo com as análises estatísticas, as concentrações $1,0 \times 10^7$ UFC/mL até a $1,0 \times 10^{-2}$ UFC/mL, apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as condições autoclavado e não autoclavado do revestimento de amido de mandioca (Figura 35). A triplicata da concentração $1,0 \times 10^8$ UFC/mL não ficou dentro da margem de confiabilidade, pois apresentou um alto grau de dispersão entre a média. Além disso, esta concentração não passou pelo teste de normalidade.

Figura 35 – Inibição do crescimento bacteriano (%) após 24 horas de incubação.

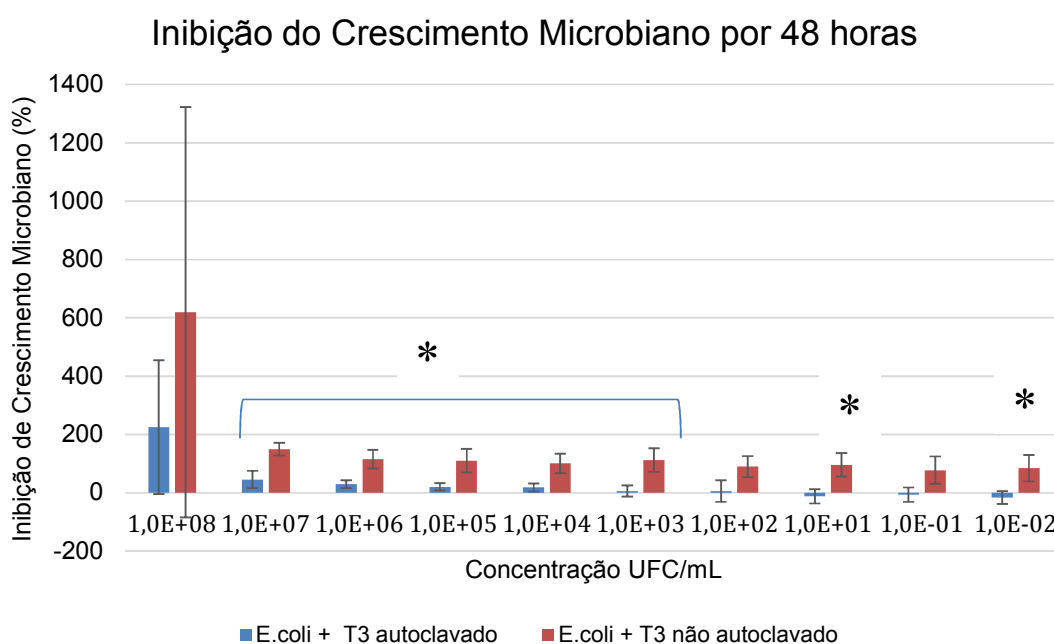


* Apresentou diferença significativa entre os grupos pelo teste de anova com $p \leq 0,05$.

Ainda de acordo com Figura 35, foi possível observar que, após 24 horas, o percentual de inibição da solução de amido não autoclavado foi superior para todas as concentrações em relação à solução autoclavada. Algumas concentrações do amido não autoclavado apresentaram um percentual de inibição superior a 100%, o que significa que além de inibir o crescimento bacteriano da *E. coli*, houve também um crescimento de bactéria do próprio amido.

De acordo com o gráfico de inibição no tempo de 48 horas, o intervalo de concentrações $1,0 \times 10^7$ UFC/mL - $1,0 \times 10^3$ UFC/mL, e as concentrações $1,0 \times 10^1$ UFC/mL e $1,0 \times 10^{-2}$ UFC/mL, apresentaram diferença significativa entre as condições do amido autoclavado e o não autoclavado (Figura 36). Inversamente, na concentração 10×10^8 UFC/mL a triplicata não foi reprodutível, pois o desvio padrão ficou muito distante da média, e também não passou pelo teste de normalidade.

Figura 36 – Inibição do crescimento bacteriano (%) após 48 horas de incubação



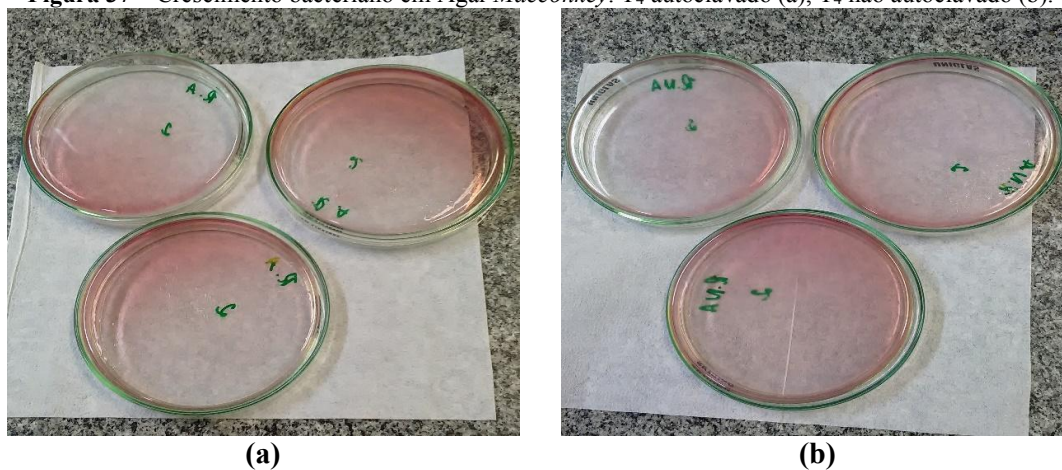
* Apresentou diferença significativa entre os grupos pelo teste de anova com $p \leq 0,05$.

Ainda de acordo com o gráfico de inibição de 48 horas (Figura 36), assim como no tempo de 24 horas, com um tempo 48 horas a solução do amido não autoclavado (T_3), apresentou uma inibição acima de 100% para maioria das concentrações, demonstrando um crescimento também de bactérias presente no amido, conforme demonstrado nas placas de Agar Nutriente (Figura 30), o crescimento foi expressivo para o T_3 não autoclavada.

5.2.3 Revestimento de amido de mandioca e kefir (T4)

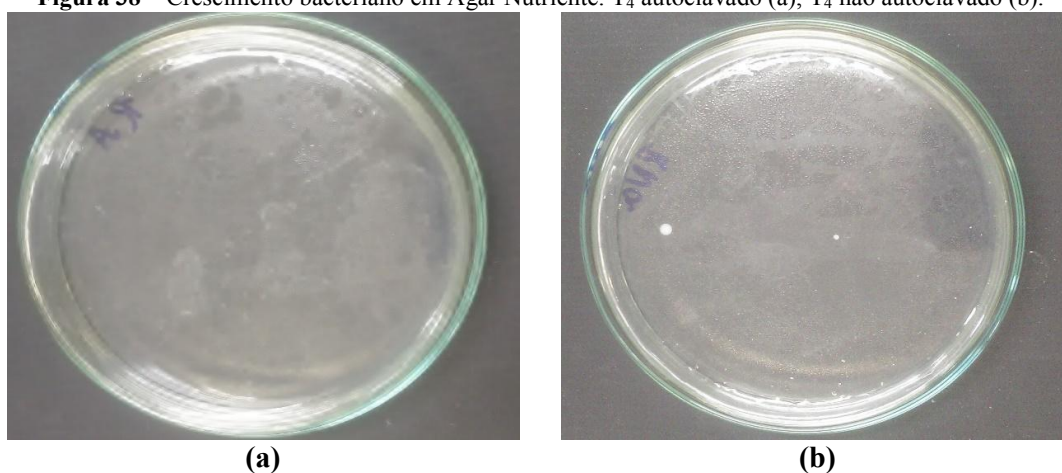
O revestimento de amido de mandioca e kefir não apresentou crescimento bacteriano em Ágar Macconkey conforme se observou nas placas de petri (Figura 37). Pôde-se a partir daí, concluir que não houve presença de bactérias do grupo gram-negativas na cobertura.

Figura 37 – Crescimento bacteriano em Agar Macconkey. T₄ autoclavado (a), T₄ não autoclavado (b).



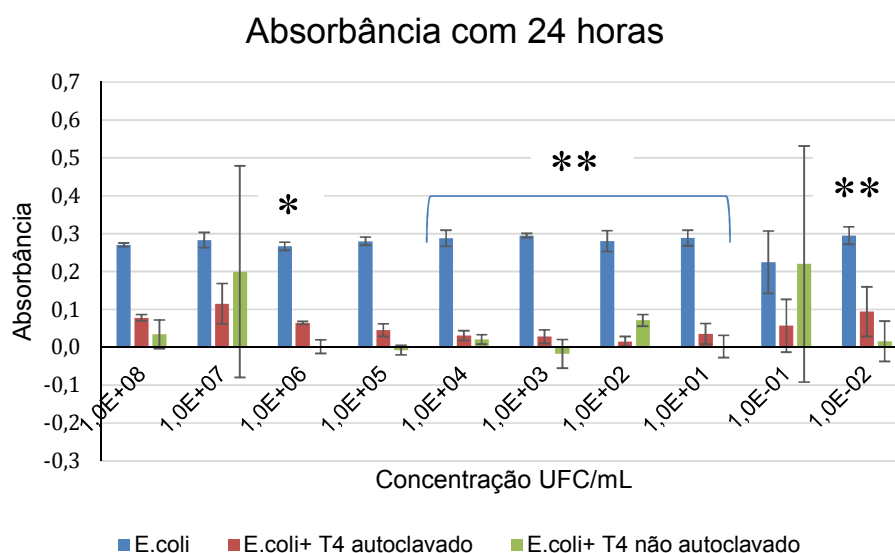
No Ágar Nutriente, observou-se a presença de colônias de bactérias na condição autoclavada e não autoclavada, caracterizando a presença de microrganismos no revestimento comestível (Figura 38). Na condição do T₄ autoclavado, assim como T₃, a autoclave não conseguiu matar todos os microrganismos presente no meio, talvez o tempo de autoclave foi pequeno para essa amostra.

Figura 38 – Crescimento bacteriano em Agar Nutriente. T₄ autoclavado (a), T₄ não autoclavado (b).



Com 24 horas de incubação, o crescimento da *E. coli* apresentou pequenas alterações entre as concentrações, muito provavelmente pelo fato de a bactéria se encontrar na fase estacionária (Figura 39). Observa-se ainda que o T₄ autoclavado e o não autoclavado inibiram o crescimento da *E. coli* de forma bastante efetiva, podendo-se assim afirmar que o T₄ teve atuação inibitória em relação ao crescimento desse microrganismo. Apresentaram diferença estatística entre as amostras apenas as concentrações 1,0 x 10⁶ UFC/mL, a faixa 1,0 x 10⁴ UFC/mL - 1,0 x 10¹ UFC/mL e a concentração 1,0 x 10⁻² UFC/mL.

Figura 39 – Crescimento bacteriano após 24 horas

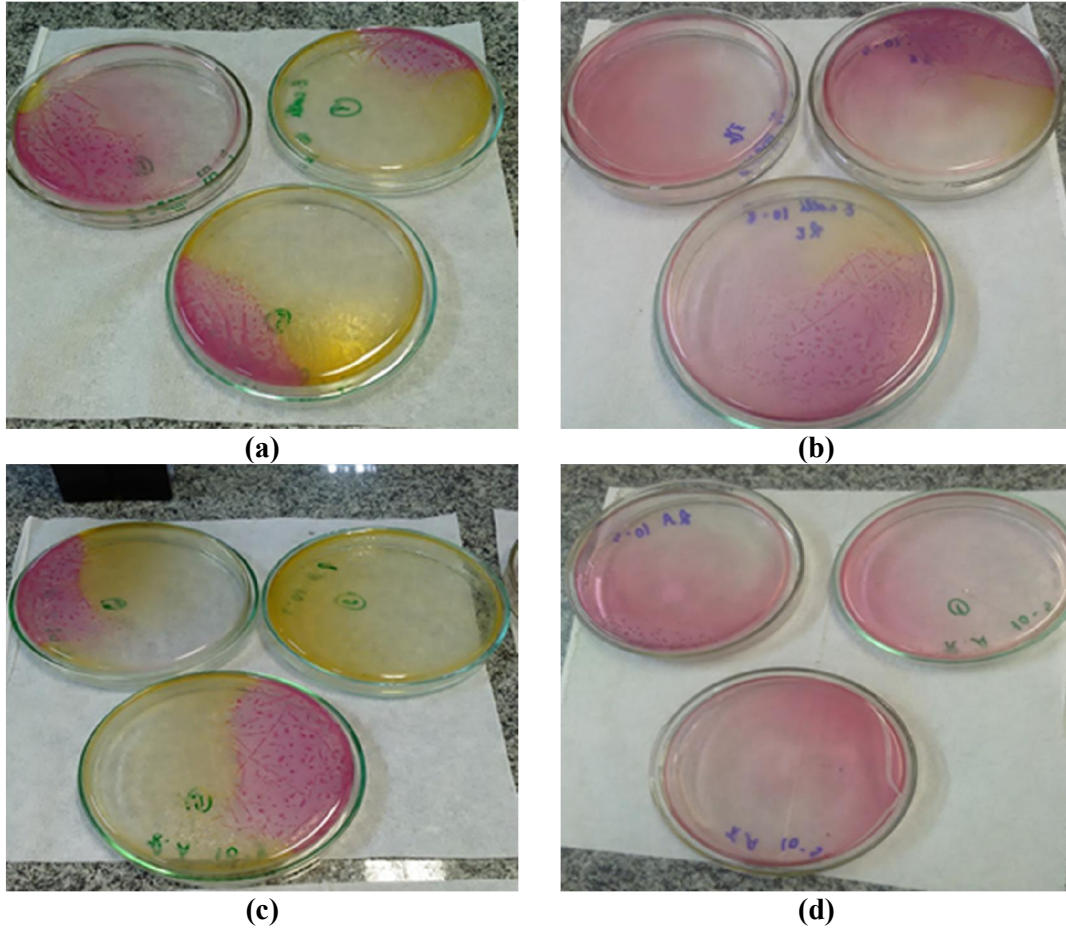


** Apresentaram diferença significativa pelo teste de Anova ($p \leq 0,05$), apenas *E. coli* em relação ao T₄ autoclavado e T₄ não autoclavado.

* Apresentaram diferença significativa pelo teste de Anova $p \leq 0,05$ entre si.

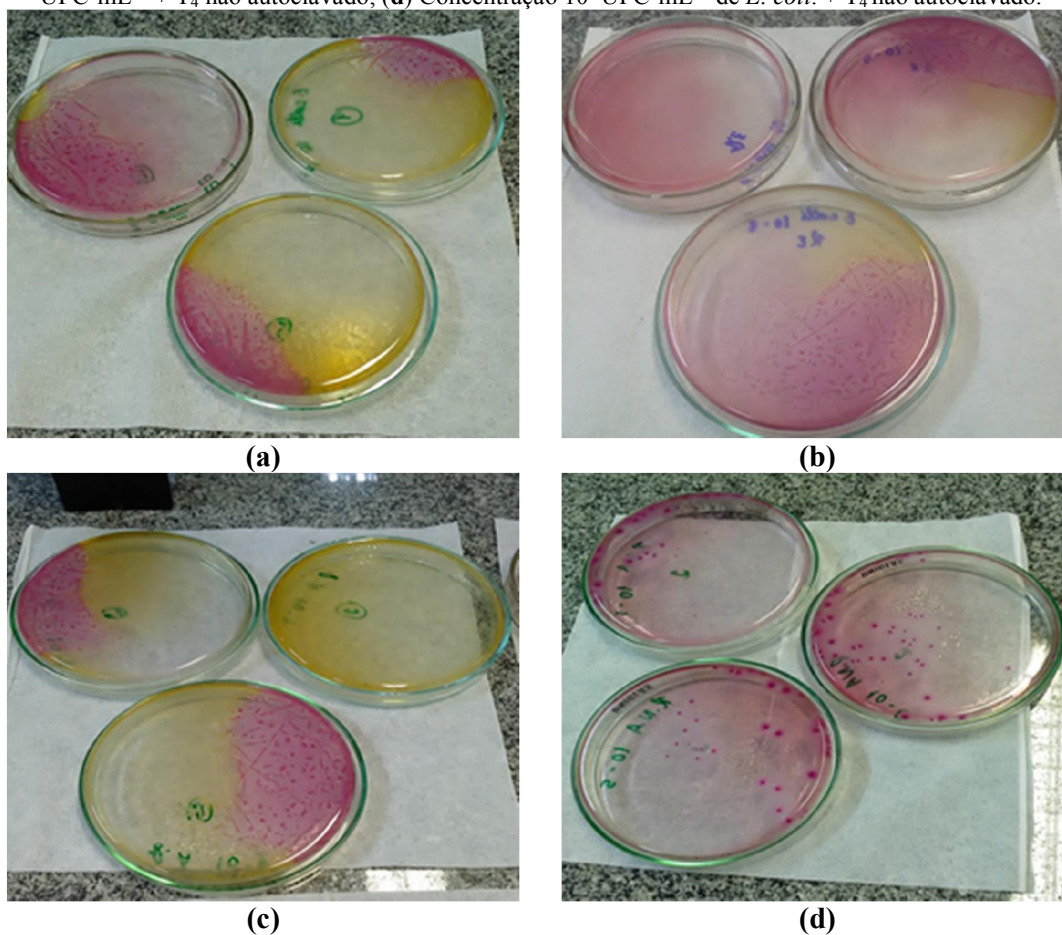
De acordo com Figura 40, observou-se uma diminuição no crescimento de *E. coli* nas placas do T₄ autoclavado para duas concentrações (Figuras 40 c e 40d), sendo observado um efeito mais significativo na concentração 1,0 x 10⁴ UFC/mL. Como relatado anteriormente, a coloração amarela observada nas placas de petri, significa uma diminuição de nutriente do meio de cultura, diminuindo assim o crescimento bacteriano.

Figura 40 – Crescimento bacteriano (*E. coli*) em Ágar Macconkey no tempo de 24 horas para T₃. **(a)** Concentração 10⁵ UFC·mL⁻¹ de *E. coli*; **(b)** Concentração 10⁴ UFC·mL⁻¹ de *E. coli*; **(c)** Concentração 10⁵ UFC·mL⁻¹ + T₄ autoclavado; **(d)** Concentração 10⁴ UFC·mL⁻¹ de *E. coli* + T₄ autoclavado.



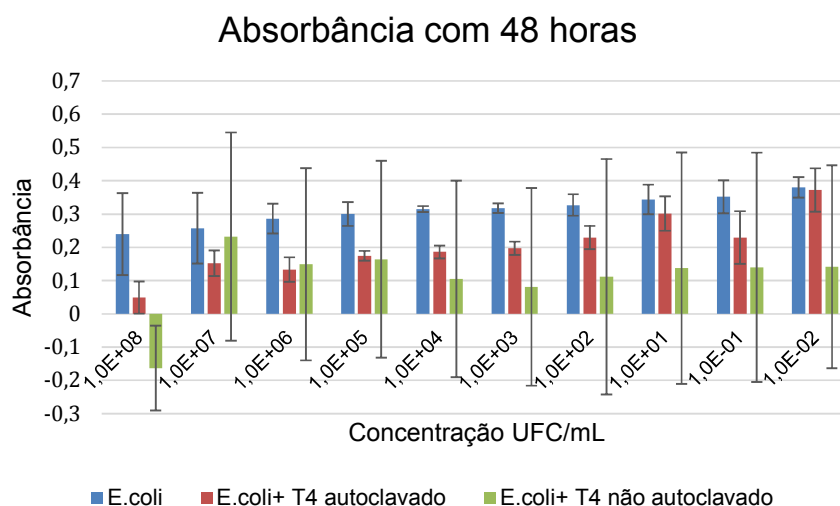
Em relação ao T₄ não autoclavado assim como no T₄ autoclavado, observou-se para a concentração 1,0 x 10⁴ UFC/mL uma inibição do crescimento da *E. coli*, ocorrendo uma diminuição na quantidade de colônias bacterianas em comparação com o placa controle (apenas *E. coli*) (Figura 41). Sendo assim, pode-se inferir que apenas a concentração 1,0 x 10⁴ UFC/mL, promoveu a diminuição no crescimento da *E. coli* quando o tratamento T₄ foi avaliado.

Figura 41 – Crescimento bacteriano (*E. coli*) em Ágar Macconkey no tempo de 24 horas para T₃. **(a)** Concentração 10⁵ UFC·mL⁻¹ de *E. coli*; **(b)** Concentração 10⁴ UFC·mL⁻¹ de *E. coli*; **(c)** Concentração 10⁵ UFC·mL⁻¹ + T₄ não autoclavado; **(d)** Concentração 10⁴ UFC·mL⁻¹ de *E. coli*. + T₄ não autoclavado.



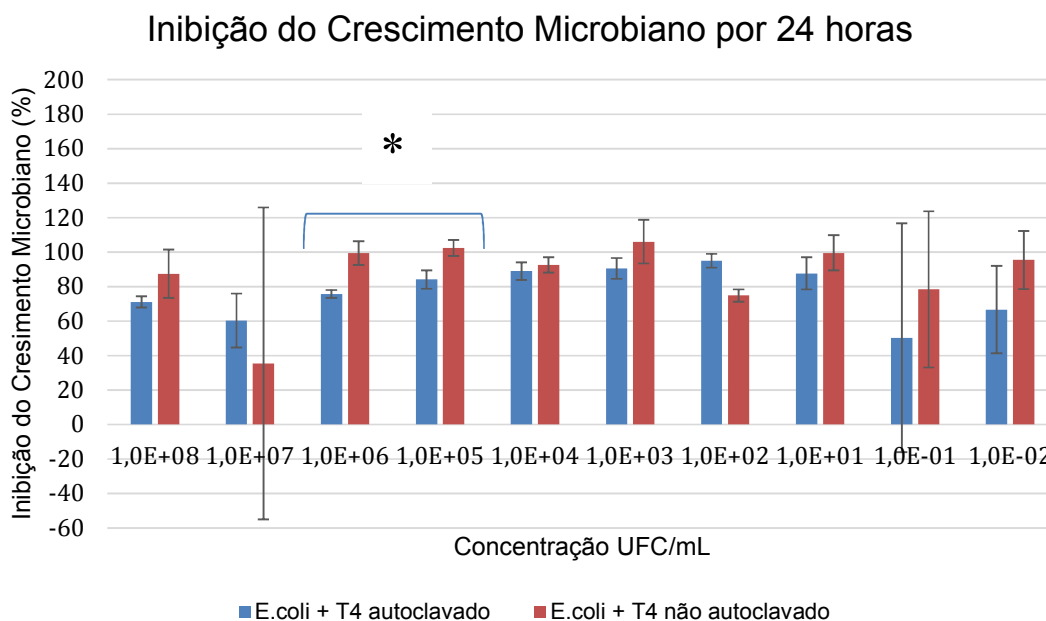
De acordo com a Figura 42, com 48 horas a inibição do crescimento da *E. coli* foi menor que no tempo de 24 horas. Em relação ao T₄ não autoclavado o crescimento da *E. coli* foi menor que o T₄ autoclavado para a maioria das concentrações, o que significa que a condição do T₄ não autoclavado teve um efeito inibitório mais efetivo frente a *E. coli* do que o T₄ autoclavado. De acordo com os tratamentos estatísticos, não houve diferença significativa entre as amostras avaliadas.

Figura 42 – Crescimento bacteriano após 48 horas para T₄.



De acordo com os tratamentos estatísticos, apenas as concentrações $1,0 \times 10^6$ UFC/mL e $1,0 \times 10^5$ UFC/mL, apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as condições do T₄ autoclavado e não autoclavado. As demais concentrações não apresentaram diferença significativa. Em relação ao desvio padrão, as concentrações $1,0 \times 10^7$ UFC/mL e $1,0 \times 10^{-1}$ UFC/mL apresentaram um desvio padrão bem distante da média, o que significa que a triplicata não ficou dentro da margem de confiança (Figura 43).

Figura 43 – Inibição do crescimento bacteriano (%) após 24 horas de incubação para T₄.



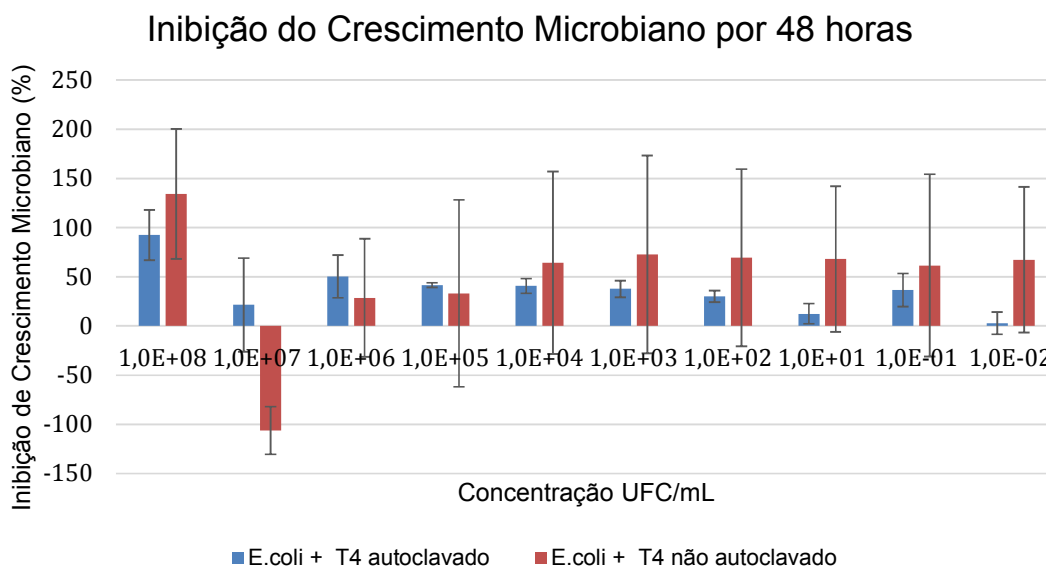
* Apresentaram diferença significativa pelo teste de Anova $p \leq 0,05$ entre si.

Ainda de acordo com a Figura 43, o percentual de inibição do revestimento de amido de mandioca + kefir (T₄) foi de quase 100% em relação a *E. coli*, em ambas as condições testadas (autoclavado e não autoclavado). O gráfico de inibição do T₄ ficou bem parecido com o gráfico de inibição do T₂ (Figura 27), o que permite concluir que o efeito de inibição no T₄ é atribuído ao soro de kefir e não ao amido.

Com base nas análises estatísticas com 48 horas, as condições do T₄ autoclavado e não autoclavado não apresentaram diferença significativa entre si em todas as concentrações. Para a concentração $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, a triplicata não se apresentou dentro da margem de confiabilidade, ou seja, apresentou um desvio padrão não reprodutivo (Figura 44).

Com 48 horas de incubação, o efeito inibitório do T₄ frente a *E. coli* foi menos eficiente para esse microrganismo que a incubação de 24 horas. Neste caso, o percentual de inibição ficou abaixo de 80%, com exceção apenas da concentração $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, que apresentou uma inibição de 120% na condição do T₄ não autoclavado, e uma inibição de aproximadamente 92% na condição do T₄ autoclavado, conforme demonstra a Figura 44. Para o revestimento de kefir + amido (T₄), a condição não autoclavada apresentou maior efeito de inibição.

Figura 44 – Inibição do crescimento bacteriano (%) após 48 horas de incubação para T₄.

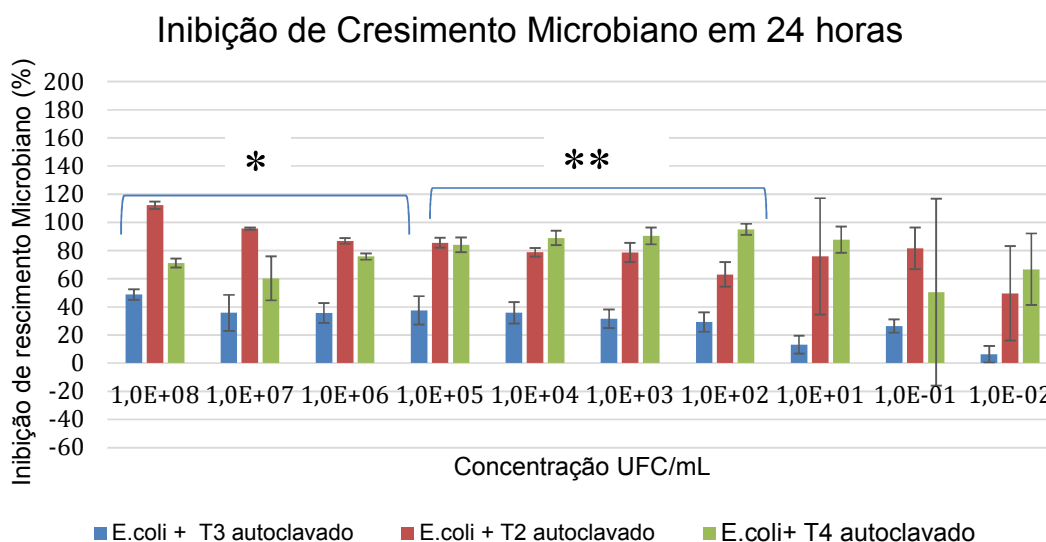


5.2.4 Grupo autoclavado (T₂, T₃ e T₄)

De acordo com os testes estatísticos, com um tempo de incubação de 24 horas as concentrações $1,0 \times 10^8$ UFC/mL até $1,0 \times 10^6$ UFC/mL, apresentaram diferença significativa entre os três grupos (T₂, T₃ e T₄). Já para o intervalo de concentrações $1,0 \times 10^5$ UFC/mL - $1,0 \times 10^2$ UFC/mL, apenas o T₃ apresentou diferença significativa entre o T₂ e T₄ (Figura 45). As concentrações $1,0 \times 10^1$ UFC/mL, $1,0 \times 10^{-1}$ UFC/mL e $1,0 \times 10^{-2}$ UFC/mL, não passaram pelo teste Anova, pois apresentaram um desvio padrão muito distante da média. Nesse caso, as triplicatas teriam que ser refeitas para minimizar os efeitos de erros.

Ainda conforme observado na Figura 45, os grupo T₂ e T₄ foram os que apresentaram um maior percentual de inibição frente a bactéria *E. coli* com um tempo de 24 horas, apresentando, assim, uma melhor ação antimicrobiana.

Figura 45 – Inibição do Crescimento Microbiano (%) para o grupo autoclavado após 24 horas.



* Apresentaram diferença significativa entre os grupos pelo teste Anova com $p \leq 0,05$.

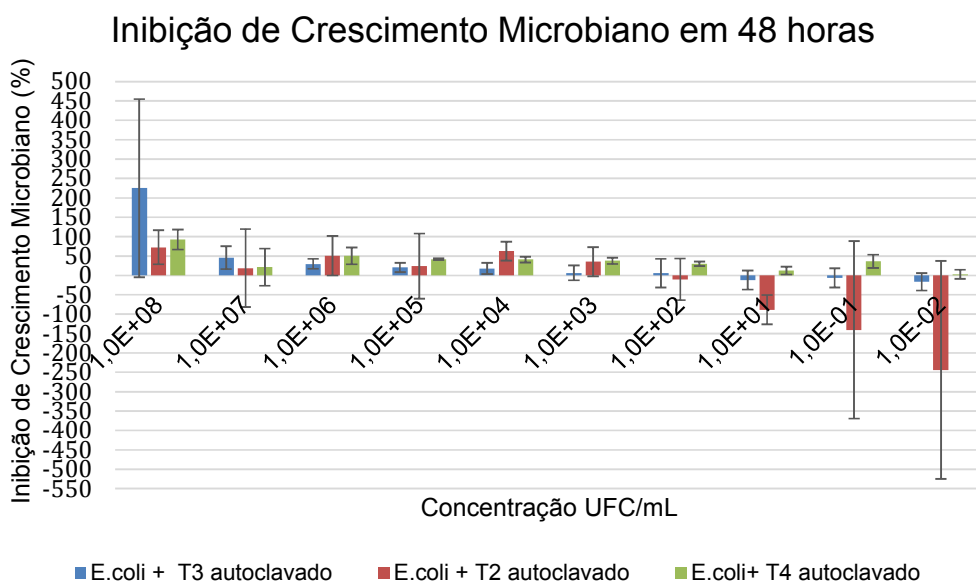
** Apresentaram diferença significativa apenas o T₄ em relação ao T₂ e T₃, pelo teste de Anova com $p \leq 0,05$.

O tratamento estatístico para o tempo de 48 horas de incubação demonstrou que os resultados não apresentaram diferença significativas para os revestimentos (T₂, T₃ e T₄). As concentrações $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, $1,0 \times 10^{-1}$ UFC/mL e $1,0 \times 10^{-2}$ UFC/mL, não tiveram uma distribuição normal, ou seja, não passaram pelo teste Anova (Figura 46).

Com relação à inibição, para um tempo de 48 horas de inibição, observou-se que o percentual inibitório foi menor para todos os grupos, quando comparados ao tempo de 24

horas de incubação (Figura 46). Daí, pode-se afirmar que o tempo de 48 horas não foi reprodutivo para as análises, pois com 48 horas as bactérias já se encontravam na fase de morte. As concentrações $1,0 \times 10^1$ UFC/mL a $1,0 \times 10^{-2}$ UFC/mL apresentaram percentuais de inibição negativos para o grupo T₂, de onde pode-se inferir que nessas concentrações os microrganismos já tinham morrido.

Figura 46 – Inibição do Crescimento Microbiano (%) para o grupo autoclavado após 48 horas.



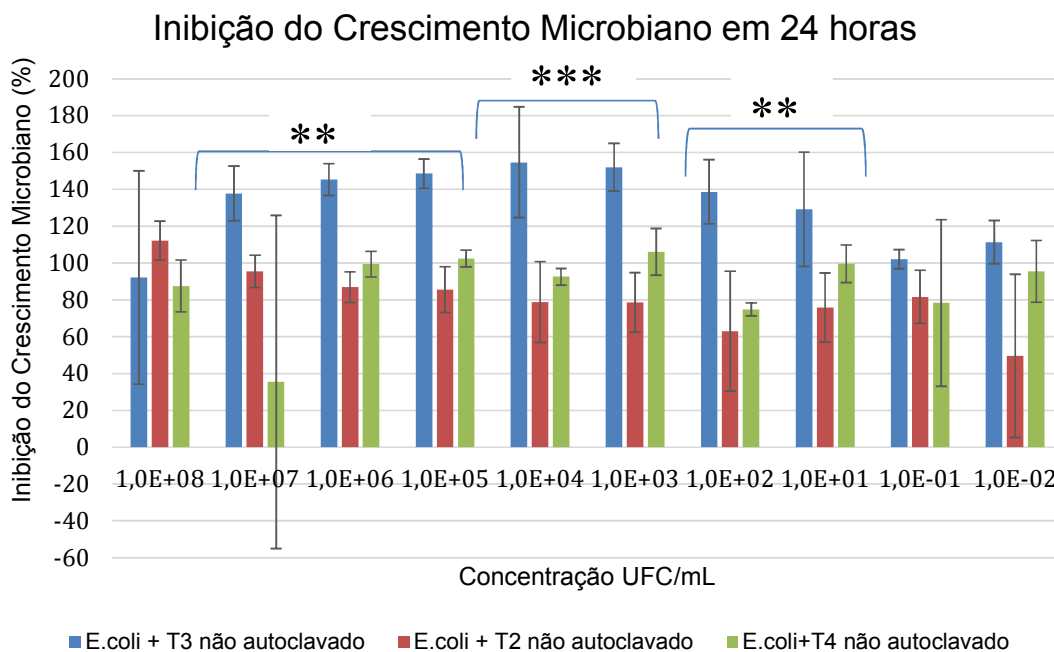
5.2.5 Grupo não autoclavado (T₂, T₃ e T₄)

Os testes estatísticos para o grupo não autoclavado demonstraram que no intervalo entre as concentrações $1,0 \times 10^7$ UFC/mL a $1,0 \times 10^5$ UFC/mL, e $1,0 \times 10^2$ UFC/mL a $1,0 \times 10^1$ UFC/mL, apenas o T₄ apresentou diferença significativa em relação ao T₂ e T₃. Já as concentrações $1,0 \times 10^2$ UFC/mL e $1,0 \times 10^1$ UFC/mL, apresentaram diferença significativa apenas para o T₄ em relação ao T₂. Ainda, a concentração $1,0 \times 10^{-1}$ UFC/m, para o T₃ não apresentou uma distribuição normal, apresentando um desvio padrão muito distante da média (Figura 47).

De acordo com a Figura 47, o T₃ apresentou um percentual de inibição superior a 100% para a maioria das concentrações, o que significa que houve um crescimento bacteriano de microrganismos do amido. Os grupos T₂ e T₄ apresentaram um percentual de inibição próximo de 100%. Com relação ao T₃ e T₂, pode-se dizer que o soro de kefir também inibiu o crescimento de bactérias do amido, pois não se observou um percentual de inibição acima

de 100%. Sendo assim, o grupo não autoclavado apresentou melhores resultados de inibição – para todos tratamentos (T₂, T₃ e T₄) – que o grupo autoclavado, no mesmo tempo de incubação (24 horas).

Figura 47 – Inibição do Crescimento Microbiano (%) para o grupo não autoclavado após 24 horas.

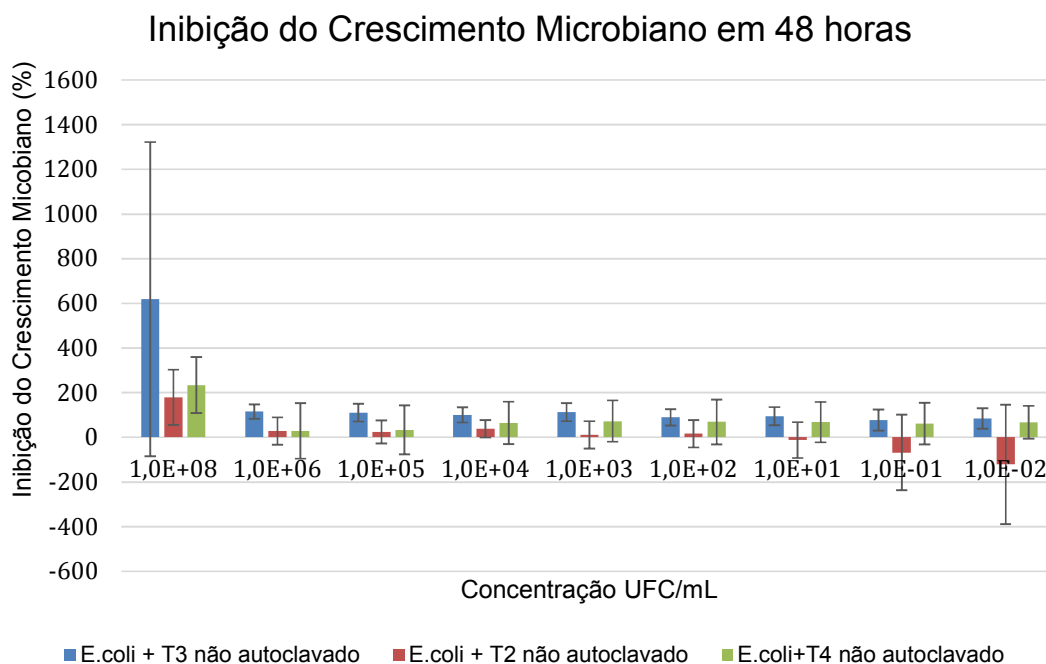


** Apresentaram diferença significativa apenas o T₃ em relação ao T₂ e T₄, pelo teste de Anova com p≤0,05.

*** Apresentou diferença significativa o T₃ em relação ao T₂, pelo teste de Anova com p≤0,05.

Assim como no grupo autoclavado, o tempo de 48 horas não foi reprodutível para as análises. O mesmo apresentou desvio padrão muito alto para a concentração 1,0 x 10⁸ UFC/mL, o que significa que nessa concentração a triplicata não foi confiável (Figura 48). Com relação a inibição do crescimento microbiano, observou-se que com 48 horas o percentual de inibição foi pouco significativo, em comparação ao tempo de 24 horas (Figura 47).

Figura 48 – Inibição do Crescimento Microbiano (%) para o grupo não autoclavado após 48 horas



6 PROPOSTAS DE TEMAS PARA O ENSINO DE QUÍMICA

O morango é rico em compostos fenólicos que apresentam atividade antioxidante, como flavonoides, antocianinas e ácidos fenólicos. É ampla a diversidade estrutural dos compostos fenólicos, podendo apresentar moléculas com mais de um anel aromático e com diferentes funções orgânicas, conforme representado na Figura 1. O trabalho e as metodologias aqui desenvolvidas podem facilmente ser empregadas em aulas práticas e teóricas na área de Química, sendo sugerida a realização, por exemplo, de uma pesquisa ampla de literatura para buscar os principais componentes do morango. Além disso, em uma aula prática, por exemplo, os professores poderiam ensinar de forma contextualizada como um alimento tão comum e rico nutricionalmente pode ter as suas características de vida melhorada por meio da produção de revestimentos comestível.

O morango tem membrana delgada e muita H₂O em sua composição favorecendo a sua degradação, após a colheita, diminuindo assim o seu tempo de vida útil. Isto ocorre pois durante o período de pós-colheita o fruto continua a respirar, transpirar e produzir hormônios do amadurecimento, como o etileno (C₂H₄), e isto acaba alterando a concentração dos gases O₂ e CO₂ e, um queda metabólica. Uma alternativa para aumentar a vida de prateleira do

morango, é a utilização de revestimentos produzidos a partir de biopolímeros como o amido e kefir, cuja função principal é diminuir a decomposição oxidativa do fruto após a colheita. Neste contexto, um outro tópico que sugerimos ser trabalhado em sala de aula explorando o que foi desenvolvido neste trabalho seria o levantamento e exploração de informações físico-químicas acerca da velocidade de decomposição do morango, e quais parâmetros poderiam ser otimizados a fim de levar ao alimento mais resistente e nutritivo possível.

O amido é um polissacarídeo (polímero natural) formado por dois polímeros de condensação: a amilose que é uma molécula linear formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -(1→4) e a amilopectina uma molécula ramificada também formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo α -(1→4) e ramificações em α -(1→6), as quais estão associadas entre si por ligações de hidrogênio, formando áreas cristalina radialmente orientadas. Já o kefir de água é uma bebida fermentada a partir de solução de açúcar mascavo, durante a fermentação são produzidas leveduras, bactérias, ácidos orgânicos como, o ácido acético, ácido láctico e álcool etílico.

No Ensino de Química, não é raro encontrarmos textos explorando a química do amido, por exemplo. Assim, em face dos resultados apresentados neste trabalho, sugerimos como ferramentas educacionais a exploração do poder antibacteriano desta substância e do kefir. Propostas interdisciplinares fazendo interface com a Biologia e cursos de área médica, biomédica e alimentos, poderiam enriquecer grandiosamente o dia-a-dia acadêmico de estudantes de ensino médio e, adicionalmente, eles teriam um melhor preparo para os programas governamentais de ingresso ao ensino superior.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

7.1 Conclusões

Este trabalho buscou o desenvolvimento de revestimentos comestíveis para ampliar o tempo de prateleira de morangos conservados *in natura*. Até onde as buscas sobre as pesquisas realizadas no IFB/*campus* Gama permitem inferir, trata-se de uma proposta pioneira, ousada e inovadora no *campus*, e que possui um grande potencial para aprimoramento. A partir das informações obtidas ao longo do trabalho foi possível observar, por exemplo, que o revestimento desenvolvido à base de amido de mandioca e kefir de água foi o que se mostrou mais eficiente na conservação pós-colheita de morangos, apresentando

resultados animadores tanto no que diz respeito aos aspectos visuais, quanto com relação à as propriedades físico-química até o 13º dia de armazenamento.

Os resultados das análises microbiológicas demonstraram que a concentração de 50% dos revestimentos T₂, T₃ e T₄ apresentaram efeito antimicrobiano frente a *E. coli* para as concentrações $1,0 \times 10^7$ UFC/mL a $1,0 \times 10^1$ UFC/mL. O grupo não autoclavado dos revestimentos T₂, T₃ e T₄, apresentou melhores efeitos inibitório frente à bactéria Gram-negativa *E. coli*.

Como proposta de um revestimento com efeito antimicrobiano, o revestimento produzido a partir da combinação de amido de mandioca e soro de kefir (T₄) apresentou resultados mais significativo pois o mesmo conseguiu aumentar o tempo de prateleira dos morangos e também demonstrou um efeito antimicrobiano efetivo frente a *E. coli*.

Os resultados promissores alcançados com este trabalho pavimentam caminho para o desenvolvimento de um produto alimentício que, além de minimizar as perdas e elevar a competitividade, possui um enorme potencial para atender aos padrões de qualidade de um mercado cada vez mais exigente de frutos *in natura*.

7.2 Perspectivas

Os resultados alcançados neste trabalho podem ser aperfeiçoados. Aliás, as otimizações e avaliações estatísticas apresentadas ainda carecem de um melhor refinamento a fim de que uma metodologia robusta e perfeitamente reprodutível possa ser implementada. Com base nos resultados obtido neste trabalho, pretende-se continuar essa pesquisa destacando-se como propostas futuras os seguintes passos:

- Repetição das análises microbiológicas com uma maior número de replicatas, e com período de tempo de incubação mais curto, sendo realizado um ensaio com intervalos de tempo de 12 horas, 24 horas e 36 horas, e focado na faixa de concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL a $1,0 \times 10^1$ UFC/mL, para visualizar-se todas as fases de crescimento bacteriano;
- Realização de análises microbiológicas dos morangos antes e depois da aplicação dos revestimentos comestíveis, e ao final do período de armazenamento.
- Isolamento e identificação dos microrganismos presentes no soro de kefir e na solução do amido;
- Estudos acerca do mecanismo de ação do agente presente na solução do amido e no soro de kefir frente a uma bactéria do grupo Gram-negativa (no caso, *E. coli*);
- Estudos acerca do mecanismo de ação do agente presente na solução de amido e no soro de kefir sobre bactérias do grupo Gram-positiva.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, L. E. C.; CARVALHO, G. L.; SANTOS, A. M. **A Cultura do morango**. 2. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011.

ALMEIDA, D. M. **Biofilme de blenda de fécula de batata e celulose bacteriana na conservação de fruta minimamente processada** 2010. 283f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2010.

AVANCINI, S.R.P. **Caracterização química, microbiológica e toxicológica da água de fermentação do amido de mandioca** 2007. 104f Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

ASSIS, O. B. G. et. al. **O uso de biopolímeros como revestimentos comestíveis protetores para conservação de frutas *in natura* e minimamente processadas**. Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, 2009.

ASSIS, O. B. G. et. al. Revestimentos comestíveis protetores em frutos minimamente processados. **Higiene Alimentar**, v. 22 n. 160, 2008.

ASSIS, O. B. G.; BRITO, D. Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações. **Campina**, v. 17 n. 2, p. 87-97, 2014.

AZEREDO, H. M. C. Película comestíveis em frutas conservada por métodos combinados: potencial da aplicação. **B. CEPPA**, v. 21, n. 2, p. 267 - 278, 2003.

BRASIL, Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução CNNPA - nº 12, **Normas Técnicas Especiais**, de 21 de Outubro de 1969. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em 15 de Agosto de 2019.

CIACCO, C. F.; CRUZ, R. **Fabricação de Amido e sua utilização**. In: Série Tecnologia Agroindustrial. Fundação Tropical de Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de São Paulo, 1982.

CUNHA, A. H. N.; VIEIRA, J. A. Detecção da Bactéria *Escherichia coli* em Águas Residuárias Empregando Sistema em Fluxo por Turbidimetria. **Revista Mirante**, v. 7, n. 2, 2014.

CAMPOS, R. P. et al. Revestimentos em morangos orgânicos ‘Camarosa’ conservados em baixa temperatura. **Braz. J. Food Technol.**, v. 12, n. 1, p. 60-67, 2009.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças - Fisiologia e manuseio**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2005.

CORDENUNSI, B. R. et al. Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. **Food Chemistry**, v. 91, p. 113-121, 2005.

CZAMANSKI, R. T. **Avaliação da Atividade Antibacteriana de Filtrados de Quefir Artesanal**. 2003. 97f. Dissertação (Mestrado) - Curso Ciências Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

DIAS, M. S. C. et. al. **101 Culturas – Manual de Tecnologias Agrícolas**. EPAMIG, Belo Horizonte. 800p. 2007.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Agricultural commodities production. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em 27 de setembro 2019.

FERNÁNDEZ, C. E. et. al. Effect of the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* LB21 on the Cariogenicity of *Streptococcus mutans* UA159 in a Dual-Species Biofilm Model. **Caries Res.**, v. 49 n. 6, p. 583-590, 2015.

FERREIRA, W. F. S. **Eficácia da água ozonizada no controle de microrganismos em morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) e efeito na qualidade físico-química durante o armazenamento**. 2017, 128f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília 2017.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, Ed. Atheneu, São Paulo, 2004.

FRIEDRICH, J. C. C. **Biofilmes a Base de Amido, Gelatina e Extrato de Tetradenia Riparia na Conservação de Morango**. 2017. 107f. Dissertação (Mestrado) - Curso Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Oeste do Paraná Toledo, 2017.

GALLANT, D.J.; BOUCHET, B.; BADWIN, P.M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, v.32, p.177-191, 1997.

GARCIA, L. C. **Aplicação de Coberturas Comestíveis em Morangos Minimamente Processados**. 2009. 143f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas- SP, 2009.

GALVÃO, M. A. **Avaliação da Eficácia da Descontaminação de Resíduos Biológicos do Subgrupo A₁ por Tratamento Térmico em Autoclave a Vapor: Um Estudo de Caso**. 2012. 85f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Exatas e Biológica, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto - MG, 2012.

GIAMPIERI, F. D. Sc. et al. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, v. 28, p. 9-19, 2012.

GIL, M. I. et al. Changes in Strawberry Anthocyanins and Other Polyphenols in Response to Carbon Dioxide Treatments. **J. Agric. Food Chem**, v. 45, p. 1662-1667, 1997.

GUINESI, L. S. et al. Kinetics of thermal degradation applied to starches from different botanical origins by non-isothermal procedures. **Thermochimica Acta**, v. 447, p. 190-196, 2006.

HANNUM, S. M. et al. Potential Impact of Strawberries on Human Health: A Review of the Science. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 1-17, 2004.

HENRIQUE, C.M.; CEREDA, M.P. Utilização de biofilmes na conservação pós-colheita de morango (*Fragaria Ananassa Duch*) cv IAC Campinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.2, p.231-233, 1999.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4^a ed. (1^a Edição digital), 2008. 1020 p.

KAPLAN, D. L. **Biopolymers from Renewable Resources**. Editora Springer, New York, 1998.

LOPES, U. P. **Podridões pós-colheita de morango: Etiologia e efeito de produtos alternativos**. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa. Dissertação de Mestrado. Fevereiro de 2011.

LOPITZOTSOA, F. et. al. Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Rev Iberoam Micol.**, v. 23, p. 67-74, 2006.

MALI, S. et al. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial. **Ciências Agrárias Londrina**, v. 31, n. 1, p. 137-156, 2010.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

MIGUEL, M. G. C. P. **Identificação de microrganismo isolados de grãos de kefir de leite e de água de diferentes localidades**. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2009.

NEPA - Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. **Tabela brasileira de composição de alimentos** / NEPA - UNICAMP. - Campinas: NEPA-UNICAMP, 2006.

OLIVEIRA, A. F. **Estudo da viabilidade da produção de biofilmes de kefir e suas interações com extratos de açaí (*Euterpe oleracea Martius*) e de gérmen de soja (*Glycine max (L.) Merrill*)**. 2016. 183 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, Universidade Federal do Amapá, Amapá, 2016.

OLIVEIRA, D. M. et al. Revestimentos biodegradáveis na pós-colheita de amora-preta armazenada sob refrigeração. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 2, p. 302-309, 2013.

PARIA, S.; KHILAR, K. C. A review on experimental studies of surfactant adsorption at the hydrophilic solid–water interface. **Advances in Colloid and Interface Science, Amsterdam**, v. 110, n. 3, p. 75-95, 2004.

PAIVA, I. M. **Caracterização Estrutural e Avaliação da Capacidade Imunomodulatória de Exopolissacarídeos Produzidos por Lactobacilos Isolados de Kefir**. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2013.

PALMU, P. S. T. **Preparação, propriedades e aplicação de biofilmes comestíveis à base de glúten de trigo**. 2003. 235 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

PIDOUX, M., et.al. Characterization of the polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. **Biotechnology Letters**, vol.10, p. 415–420, 1988.

PINELI, L. L. O. **Qualidade e potencial Antioxidante *in vitro* de morangos *in natura* e submetidos a processamentos**. 2009. 222 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília 2009.

REIS, A.; COSTA, H. **As principais doenças do morangueiro no Brasil e seu controle**. Circular técnica n. 96, Embrapa, Brasília, 2011.

RODRIGUES, M. S. A. **Biofilme a base de extrato de própolis vermelha e seu efeito na conservação pós-colheita de tomate tipo italiano**. 2015. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Sistemas Agroindustrial, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal- PB, 2015.

ROZATTO, M. R. **Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda***. 2012, 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara - SP, 2012.

SANTOS, A. E. et al. Efeito do tratamento hidrotérmico e diferentes revestimentos, na conservação pós-colheita de mangas ‘Tommy Atkins’. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, n. 1, p. 140-146, 2011.

SANTOS, F. L. et al. Kefir: Uma nova fonte alimentar funcional? **Diálogo & Ciência (Online)**, v. 10, p. 1-14, 2012.

SANTOS, J. P. V. **Avaliação da microbiota de grãos de kefir e atividade inibidora da bebida sobre algumas bactérias patogênicas**. 2008, 84f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Viçosa, Viçosa - MG, 2008.

SILVA, P. A. **Qualidade de morangos cultivados na região de Lavras-MG, armazenados em temperatura ambiente**. 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

SEBIO, L. **Desenvolvimento de Plástico Biodegradável a Base de Amido de Milho e Gelatina pelo Processo de Extrusão: Avaliação das Propriedades Mecânicas, Térmicas e de Barreira**, 2003. 179 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia em Alimentos, Faculdade de Engenharia em Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2003.

SEERAM, N. P. et al. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 97, p. 1-11, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TAPARELLI, J. R. **Modificação Química do amido de mandioca e estudo de sua aplicação em revestimento couché**. 2005. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campina- SP, 2005.

VICENTINI, N. M. **Elaboração e Caracterização de Filmes Comestíveis à Base de Fécula De Mandioca para Uso em Pós-colheita**. 2003. 216 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu - SP, 2003.

VIDYALAXME, B. et. al. Synergistic effects of probiotic *Leuconostoc mesenteroides* and *Bacillus subtilis* in malted ragi (*Eleusine corocana*) food for antagonistic activity against *V. cholerae* and other beneficial properties. **J Food Sci Technol**, v. 51, n. 11, p 3072-3082, 2014.

WALDHERR, F. W. *et al.* Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. **Food Microbiology**, v. 27, p. 672-678, 2010.

WESCHENFELDER, S. **Caracterização de kefir tradicional quanto à composição físico – química, sensorial e atividade anti – *Escherichia coli***. 2009. 72 f Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

WURZBURG, O.B. **Modified Starches: Properties and Uses**, 1989.