



Desenvolvimento de um revestimento comestível incorporado com extrato de *Geranium robertianum* L.

JOÃO PEDRO KRAUSPENHAR LOPES

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Orientado por:

Tânia Cristina de São Pedro Pires

Márcio Carocho

Maria Helene Canteri Giovanetti

Bragança, 2024

RESUMO

Com os diversos problemas ambientais enfrentados atualmente, a redução do uso de materiais de fontes não renováveis é uma estratégia para minimizar os danos causados à natureza. Dessa forma, o presente trabalho visa a redução do uso de plásticos através da formação de um revestimento comestível partindo de uma formulação já patenteada (patente portuguesa nº 110859), incorporado com extrato de *Geranium robertianum* L. obtido a partir da técnica de micro-ondas. A extração foi otimizada a fim de obter o melhor resultado para a atividade antioxidante através do método do efeito captador de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), utilizando um design experimental com variações de tempo (5-40 min), potência (150-600 W) e concentração etanólica (0-100 %), onde os parâmetros ótimos obtidos foram de 15 minutos, 545 Watts e 9% de etanol. O extrato otimizado obteve destaque nos ensaios de DPPH (EC_{50} de $5,35 \mu\text{g mL}^{-1}$) e no método da inibição da peroxidação lipídica por espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) ($8,76 \mu\text{g mL}^{-1}$). Foi também realizada a caracterização química do extrato ótimo, sendo identificados 21 compostos fenólicos através de HPLC-DAD-ESI-MS/MS, com os derivados do galol e kaempferol como os mais abundantes. O mesmo extrato foi testado para bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos, com destaque nas ações contra *Listeria monocytogenes* com concentração mínima inibitória (CMI) de $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$. Este revestimento comestível, formado com iota-carragenina como composto polimérico estruturante, incorporado com extrato de *G. robertianum* L., apresentou menores atividades antioxidantes (DPPH e TBARS com EC_{50} de $30,26$ e $20,84 \mu\text{g mL}^{-1}$, respetivamente), porém maiores potenciais antimicrobianos que o extrato, com CMIs iguais ou próximas a $3,6 \text{ mg mL}^{-1}$. As avaliações físicas do revestimento mostraram eficácia na manutenção de cor e uma pequena variância nos sete diferentes parâmetros de textura avaliados (dureza, adesividade, coesividade, elasticidade, gomosidade, mastigabilidade e resiliência) durante quatro dias, quando aplicado sobre uma maçã.

Palavras-chave: Extração, micro-ondas, carragenina, revestimento, bioatividades

ABSTRACT

With the rise of several environmental issues, reducing the use of materials from non-renewable sources is a strategy to minimize the damage caused to Nature. Thus, the present work aims to reduce the use of plastics through the development of an edible coating, based on an already patented formulation (Portuguese patent nº 110859) incorporated with *Geranium robertianum* L. extract, obtained using the microwave assisted extraction technique. The extraction was optimized to achieve the best antioxidant result through the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging method, using an experimental design with variations in time (5-40 min), power (150-600 W), and ethanol concentration (0-100%), where the optimal parameters obtained were 15 minutes, 545 Watts, and 9% ethanol. The optimized extract stood out in the DPPH (EC_{50} of $5.35 \mu\text{g mL}^{-1}$) and through the lipid peroxidation inhibition method by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ($8.76 \mu\text{g mL}^{-1}$) assays. The chemical characterization of the optimized extract was also carried out, with 21 phenolic compounds identified through HPLC-DAD-ESI-MS/MS, with galloyl and kaempferol derivatives being the most abundant, besides showing good responses against gram-positive and gram-negative bacteria, and fungi, with notable action against *Listeria monocytogenes* with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 1.25 mg mL^{-1} . This edible coating, based on iota-carrageenan according to the Portuguese patent nº 110859, but incorporated with *G. robertianum* L. extract, presented lower antioxidant activities (DPPH and TBARS with EC_{50} of 30.26 and $20.84 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively), but higher antimicrobial potentials than the pure extract, with MICs equal to or close to 3.6 mg mL^{-1} . Physical evaluations of the coating showed effectiveness in maintaining color and a small variance in the seven different texture parameters evaluated (hardness, adhesiveness, cohesiveness, elasticity, gumminess, chewiness, and resilience) over four days when applied on an apple.

Keywords: Extraction, microwave, coating, carrageenan, bioactivities.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 O género <i>Geranium</i>.....	12
2.1.1 A espécie <i>Geranium robertianum</i> L.	13
2.2 Metodologias de Extração	15
2.2.1 Maceração	15
2.2.2 Extração assistida por micro-ondas (EAM).....	16
2.2.3 Extração assistida por ultrassons (EAU).....	18
2.3 <i>Geranium robertianum</i> L. como fonte de compostos bioativos	19
2.4 Origem da carragenina e a sua utilização na indústria de alimentos	20
2.5 Revestimento comestível, uma alternativa ao plástico.....	21
2.5.1 Formação e diferentes componentes.....	23
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Preparação da Amostra	27
4.2 Metodologia de extração	27
4.2.1 Optimização do processo de extração.....	29
4.2.2 Rendimento da extração.....	29
4.3 Determinação dos compostos fenólicos.....	29
4.4 Desenvolvimento do revestimento	30
4.5 Avaliação das bioatividades.....	32
4.5.1 Atividade antioxidante.....	32

4.5.1.1 Método do efeito captador de radicais livres (DPPH).....	32
4.5.1.2 Método da Inibição da Peroxidação Lipídica por Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	33
4.5.2 Atividade antimicrobiana.....	34
4.5.2.1 Atividade antibacteriana	35
4.5.2.2 Atividade antifúngica	36
4.6 Avaliação física do revestimento.....	36
4.6.1 Avaliação da textura	37
4.6.2 Avaliação da cor	38
4.7 Análise Estatística.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Otimização da extração	41
5.2 Rendimento da extração.....	43
5.3 Compostos fenólicos do extrato otimizado de <i>G. robertianum</i> L.....	44
5.4 Avaliação das bioatividades.....	47
5.4.1 Atividade antioxidante.....	47
5.4.2 Atividade antimicrobiana.....	49
5.5 Avaliação física do revestimento.....	52
6. CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS.....	60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais compostos obtidos em diferentes estudos de extrações com <i>G. robertianum</i>	19
Tabela 2: Condições dos ensaios e respostas para a otimização dos valores de DPPH para o extrato de <i>G. robertianum</i>	41
Tabela 3: Rendimento obtido nas extrações otimizadas de <i>G. robertianum</i>	44
Tabela 4: Identificação dos compostos fenólicos do extrato otimizado de <i>G. robertianum</i>	45
Tabela 5: Resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante para o extrato de <i>Geranium robertianum</i> e o revestimento comestível	48
Tabela 6: Resultados da atividade antimicrobiana do extrato de <i>Geranium robertianum</i> e dos revestimentos comestíveis	50
Tabela 7: Cor externa e textura das maçãs tratadas com os revestimentos ao longo de 4 dias de armazenamento.	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Filogenia da família Geraniaceae.....	12
Figura 2: A planta <i>G. robertianum</i>	13
Figura 3: Distribuição geográfica de <i>G. robertianum</i> em território português continental.....	14
Figura 4: Exemplo de processo de maceração	16
Figura 5: O efeito das micro-ondas nas células vegetais	17
Figura 6: Exemplo de extração assistida por ultrassons	18
Figura 7: Estrutura química das principais classificações de carrageninas.....	20
Figura 8: Aplicação de cobertura comestível em morango.....	22
Figura 9: Aplicação de filmes comestíveis em morango.....	23
Figura 10: Amostra de <i>G. robertianum</i>	27
Figura 11: Equipamento utilizado para as EAM.....	28
Figura 12: Processo de filtração (esquerda) e evaporação (direita) dos extratos.....	28
Figura 13: Processo de formação do revestimento comestível com extrato de <i>G. robertianum</i>	31
Figura 14: Processo de dissolução dos compostos para formação do revestimento comestível com extratos de alecrim (esquerda) e gerânio (direita)	32
Figura 15: Microplacas para leitura do ensaio DPPH	33
Figura 16: Placa do ensaio TBARS	34
Figura 17: Placa de ensaio antimicrobiano.....	35
Figura 18: Revestimento comestível aplicado sobre metade de uma maçã.....	37
Figura 19: Texturómetro utilizado para as análises de textura do alimento revestido	38
Figura 20: Colorímetro utilizado para as análises de cor do alimento revestido.....	39

Figura 21: Representação do ponto ótimo onde a concentração mais baixa consegue neutralizar 50% dos radicais DPPH. A - Tempo (F1), B - Potência (F2) e C - Solvente (F3).....	42
Figura 22: Representação do ponto ótimo em gráficos 3D, combinando 2 fatores em cada gráfico.....	43
Figura 23: Extrato otimizado obtido a partir de <i>G. robertianum</i>	44
Figura 24: Revestimentos comestíveis obtidos a partir de <i>R. Offinalis</i> (esquerda) e <i>G. robertianum</i> (direita)	52
Figura 25: Revestimento comestível de <i>G. robertianum</i> aplicado sobre a maçã nos dias 1(esquerda) e 4(direita)	55
Figura 26: Média marginal estimada para a adesividade.	57

LISTA DE ABREVIATURAS

- λ_{\max} – Comprimento de onda de absorção máxima
- CMB** - Concentração mínima bactericida
- CMF** - Concentração mínima fungicida
- CMI** - Concentração mínima inibitória
- DAD** - Detetor de díodos
- DPPH** – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- EAM** – Extração assistida por micro-ondas
- EAU** – Extração assistida por ultrassons
- G. robertianum*** – *Geranium robertianum* L.
- HHDP** - Hexahidroxidifenol
- HPLC** - Cromatografia líquida de alta eficiência
- HPLC-DAD-ESI-MS/MS** – cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fotodíodos e acoplada a espectrometria de massa com ionização por electrospray
- EC₅₀** – Concentração inibitória média
- INT** – Cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio
- MS** - Detetor de espectrometria de massa
- R. officinalis*** - *Rosmarinus officinalis* L.
- TBARS** – Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico
- Tris** – Tris(hidroximetil)aminometano
- TSB** – Meio de cultura *Tryptone Soy Broth*
- UV-Vis** – Espectro visível da radiação ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

O plástico convencional, proveniente de fontes não renováveis como o petróleo, é responsável por um terço do volume total de lixo produzido mundialmente. A sua reciclagem ainda é considerada um desafio para grande parte desse material (Borrelle *et al.*, 2020). Além disso, a perda de qualidade e o desperdício de alimentos durante o período de prateleira são grandes desafios para as indústrias de alimentos minimamente processados. A qualidade de alimentos naturais, como frutas e verduras, está diretamente relacionada ao seu armazenamento e à comercialização. Desta forma, os revestimentos comestíveis surgem como alternativa para a substituição do plástico convencional evitando a deterioração microbológica e os danos físico-químicos, sendo atóxicos e capazes de conservar as suas características sensoriais (Garcia *et al.*, 2022; Suhag *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2018).

Com a crescente procura de alimentos naturais, os revestimentos comestíveis assumiram um papel muito importante na área da sustentabilidade, por serem biodegradáveis e muitas vezes formados a partir de desperdícios da indústria alimentar. Além de fornecerem uma barreira contra água, óleo e gases, apresentam grande funcionalidade sem que haja agentes químicos residuais para o consumidor final (Malgarim *et al.*, 2006; Dehghani *et al.*, 2018).

As finas camadas protetoras que revestem a estrutura dos alimentos são formadas, geralmente, por materiais biopoliméricos, como proteínas, polissacarídeos e lípidos (Assis; Britto, 2014). Embora esta técnica de revestimento não seja considerada nova, está em constante evolução. Uma abordagem promissora é o uso de compostos derivados de algas marinhas, como a iota-carragenina, como material polimérico estruturante. Além disso, a incorporação de outros compostos, como extratos obtidos a partir de plantas, nessa camada protetora pode conferir propriedades bioativas, oferecendo proteção contra microrganismos e radicais livres, resultando em diversas melhorias (Hager *et al.*, 2019).

Presentes na estrutura das mais variadas plantas, os compostos bioativos possuem características de proteção e atração de polinizadores na natureza. A extração desses princípios ativos de plantas, utilizando diferentes métodos e solventes, pode ser realizada para obter um extrato concentrado com propriedades benéficas para a saúde ou com atividades de grande relevância para utilização na indústria alimentar (Yousuf *et al.*, 2021; Bakalli *et al.*, 2008; Simões *et al.*, 2017).

O *Geranium robertianum* L. é uma espécie conhecida por possuir características medicinais nomeadamente propriedades anti-inflamatórias, hemostáticas, antidiabéticas, antibacterianas e antidiarreicas além da sua capacidade antioxidante (Graça *et al.*, 2016).

O presente trabalho tem como objetivo obter o extrato a partir de *Geranium robertianum* L., otimizar as suas condições de extração e incorporá-lo na formulação de revestimentos comestíveis à base de iota-carragenina visando aprimorar funcionalmente esse modelo de barreira protetora.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O género *Geranium*

O género *Geranium* é composto por mais de 350 espécies catalogadas, encontradas em todos os continentes e ecossistemas, com exceção dos polos e desertos áridos (Aedo, 2014). Na Europa existem 39 espécies de *Geranium* encontradas na natureza (Tutin *et al.*, 1976).

A família Geraniaceae engloba, além deste, outros cinco géneros: *Hypseocharis*, *Pelargonium*, *Monsonia*, *California* e *Erodium*, conforme a filogenia, apresentada na **Figura 1**. Juntos, estes géneros possuem mais de 400 espécies e uma distribuição geográfica mais restrita do que o *Geranium* (Marcussen; Meseguer, 2017; Ávila *et al.*, 2013). Esta família possui uma relevância económica significativa devido ao seu uso ornamental e à extração de óleos essenciais, os quais são amplamente utilizados nas indústrias de perfumaria, cosmética e aromaterapia (de Jussie, 2010).

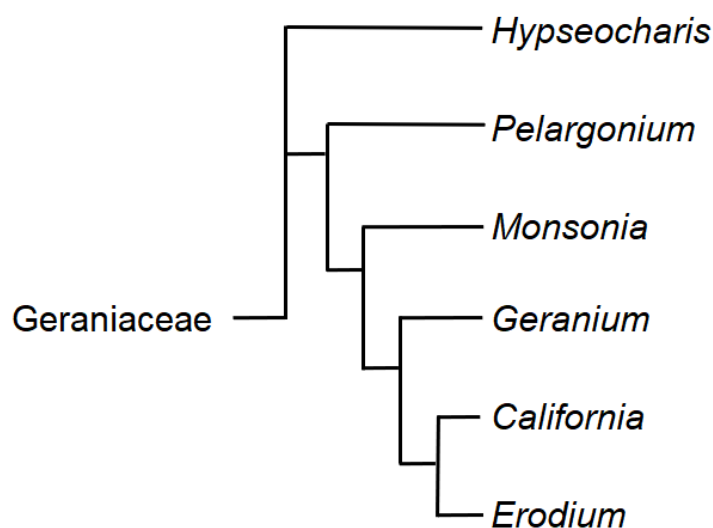


Figura 1: Filogenia da família Geraniaceae. **Fonte:** Adaptado de Weng *et al.* (2014)

O género *Geranium* é reconhecido pela presença de taninos, flavonóides, antocianinas e óleos essenciais na sua estrutura (Esfandani-Bozchaloyi *et al.*, 2018). As suas flores são protândricas e polinizadas por insetos. Com possível presença de

pêlos globulares, são capazes de expelir gotículas de néctar com pólen abundante (Konarska; Masierowska, 2020).

Alguns estudos indicam que o género *Geranium* parece aumentar a produção de outras plantas cultivadas no mesmo ambiente (Verma *et al.*, 2013) devido aos seus atributos repelentes de besouros (Held *et al.*, 2003) e borboletas, considerados pragas nesse campo (Yacoub *et al.*, 2011.) Além disso, são capazes de atrair insetos polinizadores (Masierowska *et al.*, 2018).

2.1.1 A espécie *Geranium robertianum* L.

Geranium robertianum L., popularmente conhecido como Gerânio ou erva de São Roberto, é uma planta cuja altura pode variar entre 10 e 60 cm, com caule, usualmente, avermelhado, longo, fino e frágil. As suas folhas são verdes e triangulares, atingindo até 10 cm de comprimento. As flores têm pigmento rosa ou violeta, com cinco pétalas arredondadas (**Figura 2**) permanecendo abertas entre dois a cinco dias. Os seus frutos são capazes de produzir até cinco sementes, individualmente (Tofts, 2004).



Figura 2: A planta *G. robertianum* L. **Fonte:** www.flora-on.pt

Está naturalmente presente em grande parte do território mundial, desde a Europa até ao Japão, passando também por países africanos e América do Sul (Świątek *et al.*, 2023). Em Portugal, pode ser encontrado em várias regiões, incluindo o litoral e o interior. Nas ilhas dos Açores e da Madeira, também é encontrado, especialmente em áreas mais húmidas e sombrias. A **Figura 3** apresenta a distribuição geográfica da planta em território português continental.

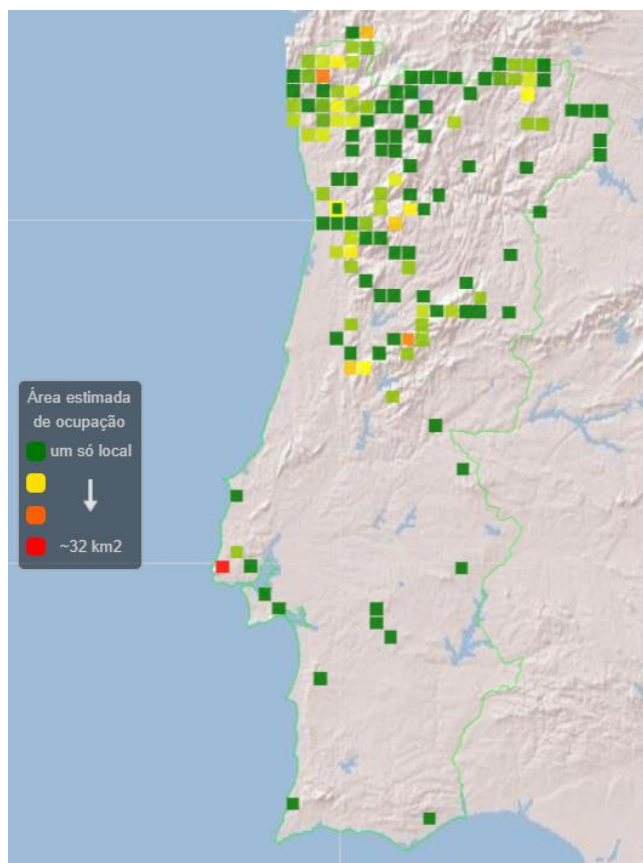


Figura 3: Distribuição geográfica de *G. robertianum* L. em território português continental. **Fonte:** www.flora-on.pt

Esta espécie é conhecida pelas suas propriedades medicinais, possuindo agentes anti-inflamatórios, hemostáticos, antidiabéticos, antibacterianos e antidiarreicos e tem sido utilizada para o tratamento de várias condições de saúde, podendo ser encontrada no mercado em diferentes formulações. Os seus efeitos terapêuticos estão associados à presença de flavonoides, taninos e ácidos fenólicos (Graça *et al.*, 2016; Tabari *et al.*, 2018; Catarino *et al.*, 2017). Os flavonoides e os ácidos fenólicos são compostos vegetais que possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, enquanto os taninos são conhecidos pelas suas propriedades adstringentes e antissépticas (Rubió *et al.*, 2013).

O efeito antioxidante desta espécie está associado às suas propriedades *redox* e à sua capacidade de bloquear a produção de espécies reativas ao oxigênio, como o radical superóxido, peróxido de hidrogênio e grupos hidroxilo. Relativamente ao seu uso medicinal, essas qualidades podem prevenir danos oxidativos no DNA e peroxidação lipídica (Rubió *et al.*, 2013).

2.2 Metodologias de Extração

A extração de compostos vegetais é utilizada para obter seletivamente compostos com bioatividades. Entre os métodos de extração inclui-se a maceração, infusão, decocção, ultrassons, micro-ondas, percolação, entre outras (Simões *et al.*, 2017).

Ao selecionar um método, é importante considerar características como a eficiência e estabilidade das substâncias, disponibilidade dos meios e custo da operação. Durante esse processo, pode ser necessário o uso de um solvente para realizar a separação dos compostos presentes na planta. Os solventes mais utilizados são água, álcool e acetona, considerados solventes polares, enquanto o éter, clorofórmio e diclorometano são mais adequados para substâncias apolares (Fritzen *et al.*, 2016).

Na tentativa de se obter um extrato parcialmente ou totalmente livre dos solventes utilizados, principalmente se alguns solventes forem tóxicos ou para a obtenção de extratos com um nível superior de pureza, os métodos de concentração e secagem devem ser utilizados. Entre os mais usados estão a evaporação a vácuo, *spray-drying* e a liofilização (Fritzen *et al.*, 2016).

2.2.1 Maceração

A maceração é um dos métodos mais comuns para a extração de plantas (**Figura 4**), e aproveita o fenómeno de difusão entre a planta e o solvente, atingindo um equilíbrio de concentração. O material vegetal fragmentado pode ser deixado em contacto com o solvente por um determinado período, o que é conhecido como maceração estática, ou pode ser submetido à agitação, o que é chamado de maceração dinâmica (Kempes *et al.*, 2014).



Figura 4: Exemplo de processo de maceração. **Fonte:** Kempes *et al.* (2014)

Devido à simplicidade da sua execução, a maceração é um método convencional, barato e verde (recorrendo ao uso de solventes biodegradáveis, como o etanol). Entretanto, entre as desvantagens deste processo incluem-se a sua lentidão, sendo um método que pode levar até 14 dias, a possibilidade de contaminação dependendo do solvente utilizado e a sua ineficiência, uma vez que a maceração não é capaz de extrair diversos compostos bioativos presentes (Melecchi, 2005).

2.2.2 Extração assistida por micro-ondas (EAM)

As micro-ondas são radiações eletromagnéticas com frequências entre 300 MHz e 300 GHz (Vinatoru *et al.*, 2017). São utilizadas em processos de extração por proporcionar aquecimento do solvente e/ou do líquido da matriz vegetal, penetrando no produto e aquecendo todo o material presente. Diferentemente do aquecimento condutivo, as micro-ondas são capazes de aquecer todo o volume da amostra de forma instantânea (Cravotto *et al.*, 2008; Bouras *et al.*, 2015; Wang e Weller, 2006).

Sendo uma forma de energia não ionizante, o aquecimento da amostra depende da capacidade do solvente em absorver essa forma de radiação, interrompendo as ligações de hidrogénio e promovendo a rotação dipolo (Cravotto *et al.*, 2008; Panja, 2018). A água, o metanol e o etanol, são solventes com alta

absorbância enquanto o hexano, o tolueno e o diclorometano não absorvem este tipo de radiação e, portanto, não são utilizados nesta técnica de extração (Panja, 2018).

Entretanto, a EAM sem solventes também pode ser realizada, normalmente, para a obtenção de compostos de alta volatilidade (Begade; Patil, 2021; Vinatoru *et al.*, 2017). O objetivo da EAM sem solventes é aquecer a pequena quantidade de umidade que se encontra dentro da célula vegetal, a partir de radiação, criando pressão interna e rompendo a parede celular, libertando, dessa forma, água juntamente com o extrato desejado (**Figura 5**) (Belwal *et al.*, 2020). Em extrações nas quais a planta seca é utilizada, pode ser necessária uma reidratação (Vinatoru *et al.*, 2017).

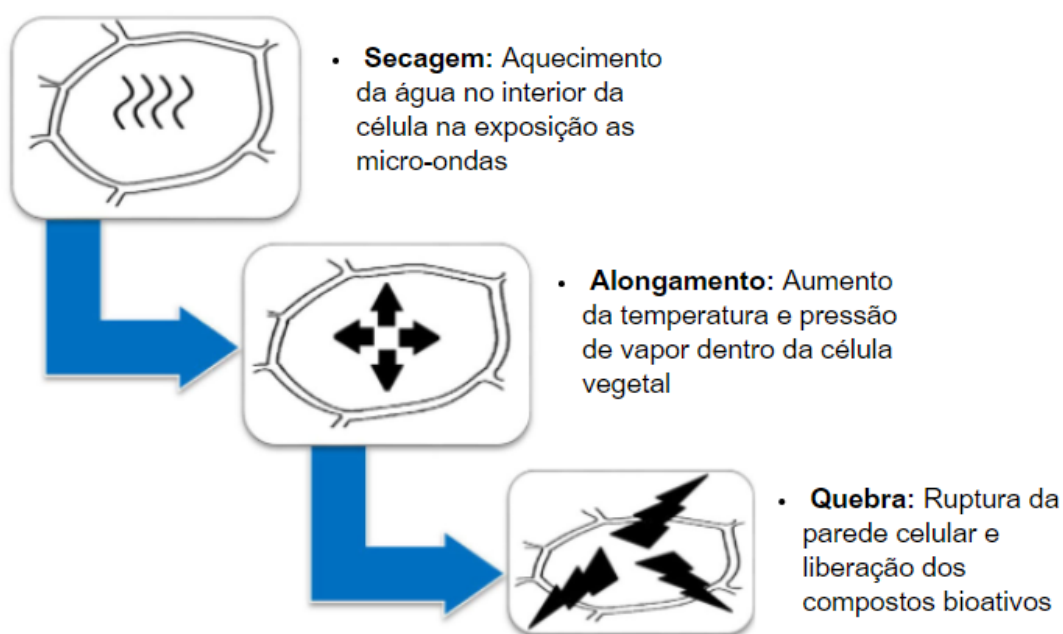


Figura 5: O efeito das micro-ondas nas células vegetais. **Fonte:** Adaptado de Begade; Patil (2021)

Em comparação com métodos convencionais, a EAM apresenta maior rendimento devido ao menor tempo de processo e consumo de solventes. Com isso, o custo de operação torna-se mais baixo e sua qualidade tende a aumentar (Li *et al.*, 2010; Galan *et al.*, 2017). No entanto, além do alto custo do equipamento, devem ser tomados cuidados ao utilizar frequências mais altas nesta extração. No estudo de Hashemi-Moghaddam *et al.* (2013), é comprovada a diminuição de monoterpenos presentes em extrações acima de 700 W.

Nesse sentido, parâmetros como tempo de extração, potência do aparelho e a fração solvente/substrato, alteram a qualidade e a quantidade do extrato obtido, sendo necessária a adequação para cada material utilizado (Kumar *et al.*, 2019).

2.2.3 Extração assistida por ultrassons (EAU)

Utilizando ondas mecânicas, na presença de solventes, a extração assistida por ultrassons faz uso dessa forma de energia para extrair os compostos alvo de diferentes fontes orgânicas (Chemat *et al.*, 2017). A **Figura 6** ilustra um exemplo de extração assistida por ultrassons.

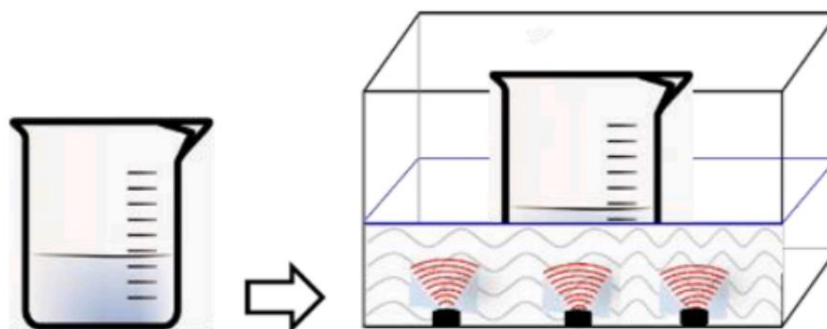


Figura 6: Exemplo de extração assistida por ultrassons. **Fonte:** Adaptado de Khadhraoui *et al.* (2021)

Esta forma de ondas é capaz de formar bolhas de cavitação na amostra, acelerando a velocidade de colisão entre partículas e causando a fragmentação na estrutura celular da planta. A partir dos fragmentos e o conseqüente aumento da área de contacto, o solvente é capaz de penetrar facilmente no material, acelerando a solubilização dos compostos (Roselló-Soto *et al.*, 2015; Chanioti *et al.*, 2017).

O método de extração com ondas ultrassônicas, muitas vezes, destaca-se entre as restantes metodologias, devido ao seu maior rendimento, com diminuição do tempo e de temperatura do processo. Além disso, Tian *et al.* (2013) descrevem uma menor deterioração térmica da planta, conservando as propriedades moleculares e estruturais dos compostos bioativos. Entretanto, o custo do aparelho, a necessidade de um método de filtração posterior, além da impossibilidade de renovação do solvente durante a extração, sendo sua solubilidade uma limitação do processo, são algumas das desvantagens presentes neste método (Castro e García-Ayuso, 1998).

2.3 *Geranium robertianum* L. como fonte de compostos bioativos

Usualmente obtidos através de decocções ou macerações, os extratos de *G. robertianum* L. apresentam bioatividades, nomeadamente atividades antioxidantes, anti-inflamatórias (Catarino *et al.*, 2017) e antibacterianas (Ilić *et al.*, 2021), uma vez que, quimicamente, essa planta apresenta na sua constituição, compostos fenólicos, responsáveis por essas bioatividades (Graça *et al.*, 2016).

Recorrendo a diferentes solventes, Graça *et al.* (2017) compararam a extração da espécie recolhida em Bragança – Portugal com acetona, acetato de etilo e metanol. Neste estudo, as extrações realizadas com acetona demonstraram melhores bioatividades em relação aos outros solventes utilizados.

Para Paun *et al.* (2012), a maceração (50% de etanol (v/v)) mostrou-se muito mais eficiente do que a realizada com água destilada. No extrato aquoso, o ácido caféico foi o composto maioritário (10,97 mg kg⁻¹). Por outro lado, no extrato alcoólico, a quantidade desse mesmo composto duplicou o seu conteúdo (25,28 mg kg⁻¹), e o kaempferol foi o que atingiu a maior concentração (375,30 mg kg⁻¹).

A **Tabela 1** indica diferentes métodos de extração, com diferentes solventes e os principais compostos obtidos.

Tabela 1: Principais compostos obtidos em diferentes estudos de extrações com *G. robertianum* L.

Método	Solvente	Principais Compostos	Referência
Decocção	Água destilada	Ácido brevifolina carboxílico	Catarino <i>et al.</i> (2017)
		Ácido Elágico Corilagina	
Maceração	Água bidestilada	Ácido elágico	Neagu <i>et al.</i> (2017)
		Rutina Luteolina	
Maceração	Água destilada	Ácido caféico	Paun <i>et al.</i> (2012)
		Rutina	
	Etanol	Ácido ferúlico	
		Canferol Quercetina Rutina	

2.4 Origem da carragenina e a sua utilização na indústria de alimentos

A carragenina foi extraída pela primeira vez em 1837 a partir de algas vermelhas, utilizadas para aumentar a viscosidade do leite consumido da época. Plantas industriais para esse processo começaram a ser implementadas em 1930, nos Estados Unidos (Aditivos e Ingredientes, 2016).

As carrageninas são um grupo de polissacarídeos naturais encontrados em várias espécies de algas vermelhas, como *Eucheuma spinosum* e *Eucheuma cottonii*. A sua extração ocorre a partir da diluição em solução alcalina, seguida da filtração, concentração e precipitação, obtendo um material altamente fibroso (Khalil *et al.*, 2017).

A sua classificação é feita conforme o conteúdo e a distribuição dos grupos éster sulfatos na sua estrutura, em seis diferentes formas: Kappa (κ), Iota (ι), Lambda (λ), Mu (μ), Nu (ν) e Theta (θ), sendo as três primeiras as mais relevantes comercialmente (**Figura 7**) (Li *et al.*, 2014).

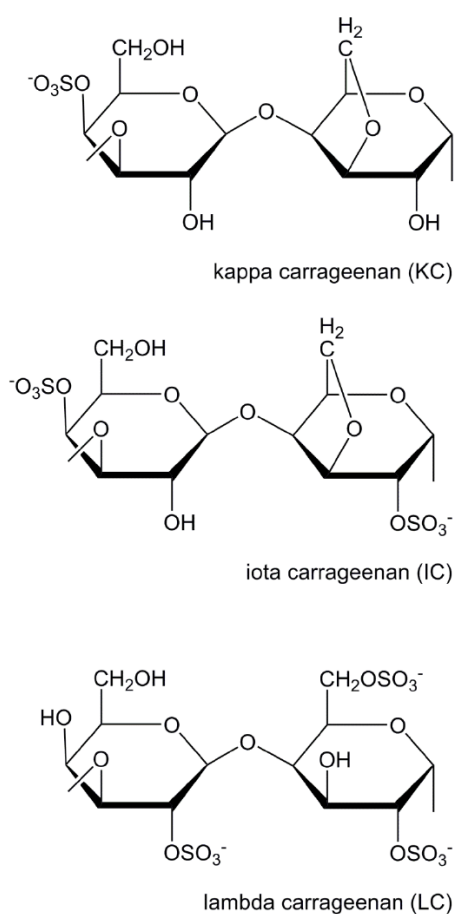


Figura 7: Estrutura química das principais classificações de carrageninas **Fonte:** Adaptado de Dul *et al.* (2015)

As carrageninas são formadas por repetidas unidades de galactose, numa alternância de β -D-galactopiranosose e α -D-galactopiranosose ou então de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose, conferindo um alto peso molecular à substância (Rehman *et al.*, 2019).

Na indústria de alimentos a carragenina é utilizada para melhorar a textura de queijo cottage, pudins e outras sobremesas lácteas devido às suas características gelificantes, espessantes e emulsificantes, além de atuar como estabilizante no tratamento de carnes com baixo teor de gordura como hambúrgueres e salsichas (Li *et al.*, 2014; Satla, Gaikwad, 2011). O uso de aproximadamente 0,5% de carragenina nesses alimentos têm ótima aceitabilidade pelos consumidores (Kumar; Sharma, 2004).

Na biotecnologia, as carrageninas podem atuar na imobilização de células e enzimas (Necas; Bartosikova, 2013), na liberação de medicamentos, assim como na formulação de cápsulas medicinais (Salgueiro *et al.*, 2013).

Em soluções aquosas, a iota-carragenina é capaz de formar géis termoreversíveis após ser arrefecida, ação promovida pelos catiões presentes como potássio, cálcio e sódio (Yuguchi *et al.*, 2002).

2.5 Revestimento comestível, uma alternativa ao plástico

Anualmente, cerca de 22 milhões de toneladas de resíduos plásticos são descartados no meio ambiente, representando cerca de um terço de todo o lixo produzido. Em embalagem para alimentos, pode-se citar o uso de poliamida, polietileno tereftalato (PET), álcool etileno vinílico, cloreto de polivinilideno, polipropileno e o polietileno, materiais que podem promover a migração dos seus compostos residuais para o alimento por ele embalado. A reciclagem desses materiais, apesar dos esforços em curso, ainda é considerada um desafio significativo para a maior parte desse volume (Borrelle *et al.*, 2020; Carochó *et al.*, 2019).

Com o intuito de substituir os plásticos derivados do petróleo, os biofilmes e revestimentos comestíveis têm sido objeto de extensos estudos, devido à sua capacidade de preservar as características originais dos produtos, aumentando o seu tempo de prateleira (Lazaridou; Biliaderis, 2020). Além disso, esses revestimentos promovem a estabilidade da qualidade e dos valores nutricionais dos alimentos a preços acessíveis (Bhardwaj *et al.*, 2019).

Uma das grandes vantagens deste modelo de proteção, em comparação com embalagens poliméricas sintéticas, está na sua integração ao produto alimentar, eliminando a produção de novos volumes de descarte, uma vez que é aplicado diretamente ao produto e consumido juntamente com ele (Kumar *et al.*, 2023).

Esses revestimentos, formados a partir de biopolímeros, como proteínas, lípidos e polissacarídeos, possuem uma barreira eficaz contra a entrada de oxigênio, o que mantém o aroma e o sabor do produto (Valdés *et al.*, 2015). Em comparação com revestimentos sintéticos e/ou químicos, os revestimentos comestíveis compostos por ingredientes naturais, além de serem biodegradáveis são preferidos pelos consumidores, principalmente por aqueles que procuram uma alimentação mais saudável (Yousuf *et al.*, 2021).

Um revestimento comestível é uma fina camada protetora aplicada sobre a superfície de alimentos frescos, fragmentados ou inteiros. Embora o seu uso, para a proteção de alimentos, não seja uma técnica nova na agricultura, ela tem vindo a ser aprimorada através da adição de outros compostos (Hager *et al.*, 2019).

Entre os seus modelos de aplicação encontram-se as coberturas e os filmes comestíveis. As coberturas (**Figura 8**) são formadas em contato com o próprio alimento, através de pulverização, leito-fluidizado ou imersão. Para as coberturas, o método de imersão é o mais utilizado por não precisar de máquinas específicas, apresentando um custo de operação menor comparado com outras técnicas (Ananey-Obiri *et al.*, 2018).



Figura 8: Aplicação de cobertura comestível em morango. **Fonte:** Neo.life (2022)

No caso dos filmes (**Figura 9**), também chamados de biofilmes ou bioplásticos, a formação é conduzida para a posterior aplicação como embalagens (Yong; Liu, 2021; Lara *et al.*, 2020).



Figura 9: Aplicação de filmes comestíveis em morango. **Fonte:** Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial (2011)

Segundo Lafece *et al.* (2023) o valor de mercado global para este tipo de produto tende a aumentar significativamente nos próximos anos. Os bioplásticos atingiram o valor de US\$ 2.23 milhões em 2022 com expectativa de alcançar US\$ 6.3 milhões em 2027.

2.5.1 Formação e diferentes componentes

Anualmente, são publicados diversos estudos sobre os diferentes componentes poliméricos estruturantes utilizados na formação de revestimentos biodegradáveis. Entre os mais comuns estão os provenientes de plantas, como a pectina (Velásquez *et al.*, 2021) e o amido (Vecchio, 2020), além de fontes animais (Pathak *et al.*, 2014). No entanto, ainda existem desafios relacionados ao cultivo e/ou síntese desses materiais, bem como à disponibilidade das biomassas necessárias para a sua obtenção. Nesse contexto, as algas marinhas surgem como alternativas promissoras para a produção desses revestimentos, uma vez que são encontradas em grande volume na natureza. Além disso, o cultivo de algas apresenta menor

exposição a fertilizantes e, supostamente, possui menor impacto na cadeia alimentar (Sedayu *et al.*, 2019). Desta forma, as algas marinhas representam uma fonte viável e sustentável para a produção desses materiais.

Num estudo de Carochó *et al.*, 2019, realizado pelo Centro de Investigação de Montanha (CIMO) do Instituto Politécnico de Bragança - Portugal, uma nova técnica de revestimento foi desenvolvida. Utilizando composto proveniente de algas marinhas como material estruturante, e incorporado com compostos bioativos, esse revestimento mostrou-se eficiente na manutenção da cor e textura do alimento, e apresentou capacidade de inibir a proliferação microbiana na sua superfície. Essa tecnologia foi patenteada a nível nacional e americano, sob nº 110859 e 11,751,588, respetivamente. A partir da técnica de imersão, esse revestimento foi denominado “Spraysafe”.

A carragenina é um grupo de compostos poliméricos, obtido a partir de algas marinhas, que já está a ser amplamente utilizada em várias indústrias de alimentos. Atuando como material polimérico de revestimentos comestíveis, proporciona uma excelente barreira, mesmo em condições de humidade relativamente alta, para produtos como carne congelada e peixe (evitando a desidratação superficial), invólucros de linguiças e salsichas, alimentos secos e gordurosos, entre outros (Sánchez-García *et al.*, 2010).

Destacando-se entre as outras categorias de carragenina, a iota-carragenina possui uma cadeia linear de galactanos (galactose polimerizada) parcialmente sulfatados, o que lhe confere uma excelente habilidade na formação de filmes. No entanto, as suas propriedades mecânicas e a sua barreira contra o oxigénio não são ideais, o que pode limitar a sua utilização. Como resultado, estão a ser realizados estudos para explorar a implementação de compostos bioativos a fim de ampliar a sua diversidade de aplicações (Praseptiangga *et al.*, 2021; Nouri *et al.*, 2018).

Sendo a integridade estrutural do revestimento de extrema importância para sua boa funcionalidade, *crosslinkers* e plastificantes podem ser incorporados para alterar a estrutura tridimensional polimérica da solução. Os plastificantes, substâncias de baixa volatilidade, são utilizados para auxiliar a formação desse tipo de barreira, uma vez que ele é capaz de modificar as suas propriedades mecânicas, aumentando a sua flexibilidade, extensibilidade e dispensabilidade, enquanto ocorre diminuição da rigidez. Entre as principais substâncias plastificantes destacam-se a glicerina, o sorbitol e o propilenoglicol (Espitia *et al.*, 2013; Han, 2014). Os *crosslinkers*, por sua

vez, unem cadeias poliméricas por ligações covalentes ou não covalentes, tornando a sua estrutura mais resistente ao calor, à humidade e à luz, melhorando a sua estabilidade e resistência a solventes e a agentes químicos. Pode-se citar o uso de cloreto de cálcio, polifenóis e ácido oxálico para essa função (Menzel *et al.*, 2013; Azeredo & Waldron, 2016).

Shrama *et al.* (2018) descreveram que esses revestimentos podem conter ingredientes funcionais e aditivos, os quais podem melhorar o sabor, a cor, o teor de vitaminas e o valor nutricional dos produtos. A adição de tocoferol, por exemplo, aumenta o nível de vitamina E, cálcio e β -caroteno em alimentos (Tahir *et al.*, 2019).

Durante o armazenamento, a fruta tem grande propensão ao escurecimento, fenómeno atribuído às enzimas como a polifenol oxidase, afetando a qualidade e atratividade do produto. Agentes *antibrowning*, como o ácido ascórbico e os seus derivados, têm demonstrado eficácia na prevenção desse processo quando aplicados como revestimento, conforme evidenciado em diversos estudos (Oms-Oliu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2022; Kuwar *et al.*, 2015).

Por possuir agentes antimicrobianos e antioxidantes, a incorporação de extratos de plantas nestes revestimentos tem tido grande visibilidade no meio científico nos últimos anos (Hager *et al.*, 2019). Na função de revestimentos bioativos, essa incorporação já foi comprovada na redução da proliferação de microrganismos em alimentos, melhorando a sua qualidade de conservação (Yousuf *et al.*, 2021), manutenção da cor (Salvia-Trujillo *et al.* 2015) e da massa (Dong; Wang, 2017) em frutas e verduras. Entretanto, ainda existem resultados contraditórios para essas funcionalidades de acordo com o tipo de alimento e/ou a fonte do extrato, devido à baixa solubilidade em água, ao seu odor e sua alta volatilidade, considerando estas limitações como um desafio a superar nesta incorporação (Yousuf *et al.*, 2021).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolvimento de um revestimento comestível incorporado com extrato de *G. robertianum* L., com base num revestimento patenteado.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Extração de *G. robertianum* L. através de micro-ondas e otimização de suas condições;
- 2) Caracterização e quantificação dos compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de díodos e a um detetor de espectrometria de massa com uma fonte de ionização por espalhamento de elétrons (HPLC-DAD-ESI/MS);
- 3) Avaliação da atividade antioxidante do extrato de *G. robertianum* L. através do Método do Efeito Captador de Radicais Livres (DPPH) e do Método da Inibição da Peroxidação Lipídica por Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS);
- 4) Avaliação da atividade antimicrobiana, através de ensaios colorimétricos por microdiluição para diferentes bactérias gram-positivas, gram-negativas e microscopia para fungos;
- 5) Desenvolvimento, avaliação física (textura e cor) e bioativa (antioxidante e antimicrobiana) do revestimento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparação da Amostra

A planta de *G. robertianum* L. (erva de são roberto) foi adquirida na Antiga Ervanaria, localizada em Lisboa – Portugal (**Figura 10**). A amostra foi adquirida já seca, e foi fracionada para posterior análise nos laboratórios do Centro de Investigação de Montanha do Instituto Politécnico de Bragança.



Figura 10: Amostra de *G. robertianum* L.

4.2 Metodologia de extração

O extrato de *G. robertianum* L. foi obtido por extração assistida por micro-ondas, uma vez que esta técnica ainda não foi explorada para a presente planta. Utilizando o equipamento *NuWay-Uno* da marca *NaTech* (**Figura 11**) e seguindo a metodologia de Paun *et al.* (2012), para obter um desempenho superior e de forma sustentável, uma mistura de etanol:água, com diferentes proporções, foi o solvente utilizado.



Figura 11: Equipamento utilizado para as EAM

O processo foi executado mantendo constantes o volume de extração e quantidade de amostra, respectivamente 90 mL e 3g, utilizando diferentes tempos, potências e concentrações etanólicas, seguindo um protocolo de otimização. As soluções foram filtradas, com auxílio de papel filtro (Whatman Nº4), e posteriormente evaporadas no evaporador rotativo (**Figura 12**) a 160 rpm e 35 °C. O líquido resultante desse processo foi congelado para posterior liofilização e obtenção do extrato resultante.

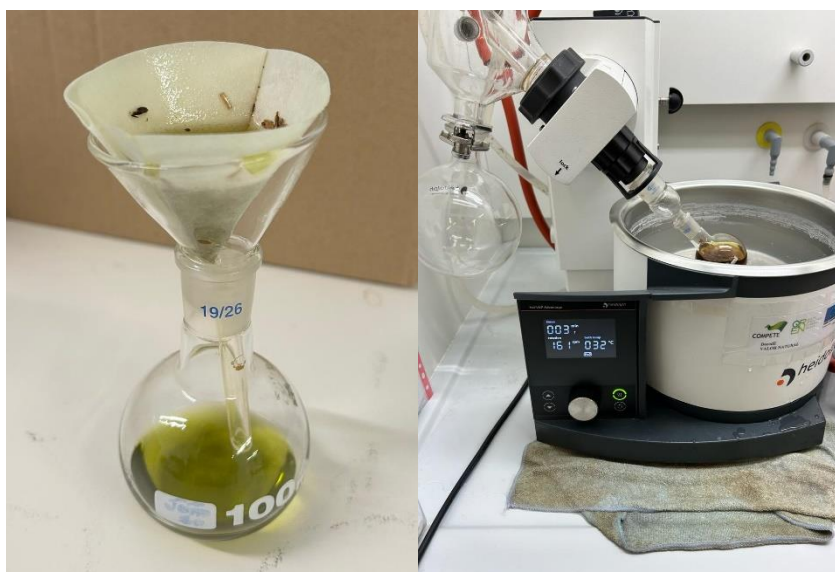


Figura 12: Processo de filtração (esquerda) e evaporação (direita) dos extratos

4.2.1 Otimização do processo de extração

De modo a obter a maior atividade antioxidante do extrato de gerânio, foi realizado um ensaio de otimização da extração através do método de superfície-resposta. Para isso foram definidos três níveis de três fatores, nomeadamente tempo de extração (Fator 1 (F₁) – T, em minutos), potência de micro-ondas (Fator 2 (F₂) – P, em Watts) e finalmente percentagem de solvente (Fator 3 (F₃) – S, etanol). Foi utilizado o desenho de Box-Behnken, resultado em 17 extrações de modo a otimizar uma resposta, (R₁), nomeadamente a maior atividade antioxidante através do método DPPH.

4.2.2 Rendimento da extração

Com a obtenção do extrato otimizado, o rendimento da extração foi calculado conforme a Equação 1, com base na razão entre a massa final do extrato liofilizado e a massa inicial de amostra utilizada.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa final (g)}}{\text{massa inicial (g)}} \times 100 \quad (1)$$

4.3 Determinação dos compostos fenólicos

Conforme a literatura (Barros *et al.*, 2013; Bessada *et al.*, 2016; Gonçalves *et al.*, 2017) o perfil dos compostos fenólicos do extrato (10 mg), diluído em 2 mL de etanol/água (20:80, v/v) foi analisado a partir de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), acoplado com um detetor de díodos (DAD), com deteção nos comprimentos de onda de 280, 330 e 370 nm, e um detetor de espectrometria de massa (MS).

A separação dos compostos foi realizada numa coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (3 µm, 150 × 4,6 mm, Waters Milford, MA, USA), a 35 °C. A fase móvel foi 0,1% de ácido fórmico em água (A) e acetonitrilo (B). O gradiente de eluição foi de 15% B (5 min), 15% B a 20% B (5 min), 20-25% B (10 min), 25-35% B (10 min), 35-50% B (10 min), e a coluna foi reequilibrada (10 min) utilizando um fluxo de 0,5 mL min⁻¹.

A análise foi feita em um HPLC Dionex Ultimate 3000 UPLC, num espectrómetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA), com fonte de ionização electrospray ESI. O sistema utilizou uma voltagem de spray a 5 kV à 325 °C com tensão capilar de -20 V, utilizando azoto como gás de arrastamento a 50 psi. Os espectros foram gravados em modo ião negativo entre 100 e 1500 m/z. A energia de colisão utilizada foi de 35 (unidades arbitrárias). Os resultados foram recolhidos e analisados a partir do programa Xcalibur® (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA).

As identificações dos compostos fenólicos foram obtidas em comparação com a literatura para os tempos de retenção e/ou aos espectros de massa UV - Vis. Já a sua quantificação foi realizada utilizando curvas de calibração preparadas com padrões apropriados. Os resultados foram expressos em mg g⁻¹ de extrato seco como média ± desvio padrão de três análises independentes.

4.4 Desenvolvimento do revestimento

Seguindo a metodologia implementada para o desenvolvimento do revestimento “Spraysafe”, da qual existe uma patente nacional e Americana sob nº 110859 e 11,751,588, respetivamente, e registradas em nome do Instituto Politécnico de Bragança, o revestimento comestível foi desenvolvido a partir de seis compostos, com as mesmas concentrações e metodologias de formação. Entretanto, a fim de comparar as principais fontes bioativas, o presente trabalho visa a substituição do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), o qual foi utilizado nas patentes citadas acima, pelo extrato otimizado de gerânio (*G. robertianum* L.). Esta comparação permite uma análise mais detalhada das suas propriedades e da eficácia em que cada extrato contribui quando incorporado no revestimento, e melhorar a atividade antioxidante deste revestimento

Para a produção do revestimento usou-se o procedimento base das patentes, com auxilio de um equipamento carousel, o qual permite agitar e aquecer várias amostras simultaneamente. O processo consiste, primeiramente, na dissolução de 1000 mg de iota-carragenina (base polimérica) em 100 mL de água destilada. A fim de facilitar essa operação, a água foi aquecida a 75 °C com agitação constante da solução a 500 rpm. Após a dissolução da base polimérica, a água foi arrefecida até aos 40 °C e foram adicionados 500 mg de extrato de *G. robertianum* L. (principal fonte

bioativa), 100 mg de tocoferol já diluído em 1 mL de etanol, 120 mg de ácido ascórbico (agente *antibrowning*), 100 mg de cloreto de cálcio (*crosslinker*) e 3 mL de glicerol (plastificante), de forma sequencial à medida que cada um se dissolvia. A **Figura 13** demonstra os passos, enquanto a **Figura 14** apresenta o processo de dissolução dos compostos.

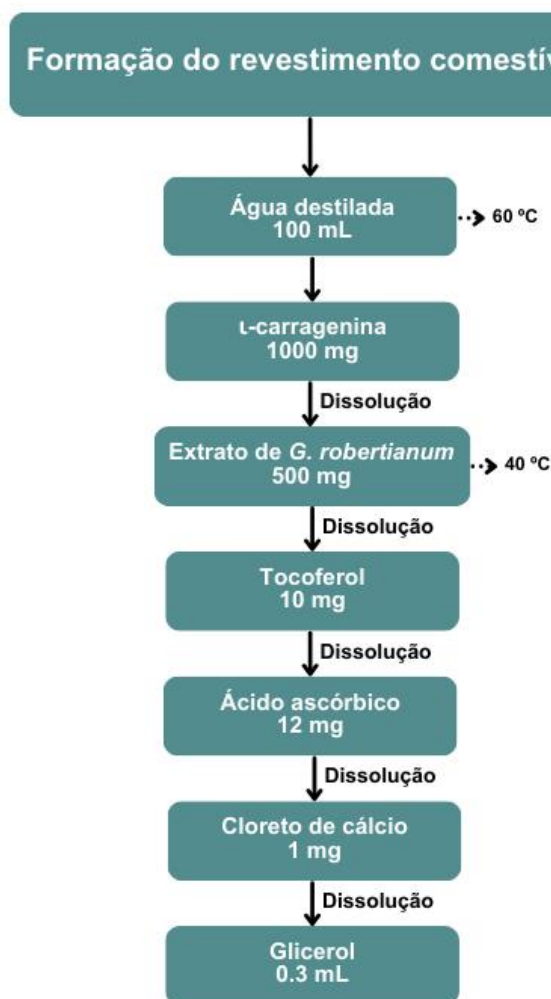


Figura 13: Processo de formação do revestimento comestível com extrato de *G. robertianum* L.



Figura 14: Processo de dissolução dos compostos para formação do revestimento comestível com extratos de alecrim (esquerda) e gerânio (direita)

4.5 Avaliação das bioatividades

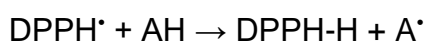
4.5.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada através de duas metodologias diferentes: ensaio do Efeito Captador de Radicais Livres (DPPH) e pelo Método da Inibição da Peroxidação Lipídica por Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), a fim de determinar a atividade dos extratos e dos revestimentos através de diferentes mecanismos.

4.5.1.1 Método do efeito captador de radicais livres (DPPH)

Descrito por Cardeñosa *et al.* (2015), o método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) consistiu na adição de 270 μL de solução metanólica do radical DPPH a $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, e 30 μL do extrato, ou revestimento, a analisar em oito diferentes concentrações (0,3; 0,15; 0,075; 0,0375; 0,018; 0,009; 0,004; 0,002 mg mL^{-1}) numa placa de 96 poços. Após uma hora, ao abrigo de luz, é feita a leitura das absorbâncias no espectrofotómetro.

O ensaio baseia-se no mecanismo de transferência de um eletrão, a partir do extrato (substância antioxidante) para a molécula de DPPH, que o aceita para se tornar estável, alterando a coloração de roxo para amarelo, conforme a reação:



A leitura foi realizada a partir da mudança de cor de cada poço da placa (**Figura 15**), uma vez que o radical livre do DPPH tem coloração violeta e se torna, gradativamente, amarelo, dependendo da concentração e do poder redutor do extrato presente (Musa *et al.*, 2013).

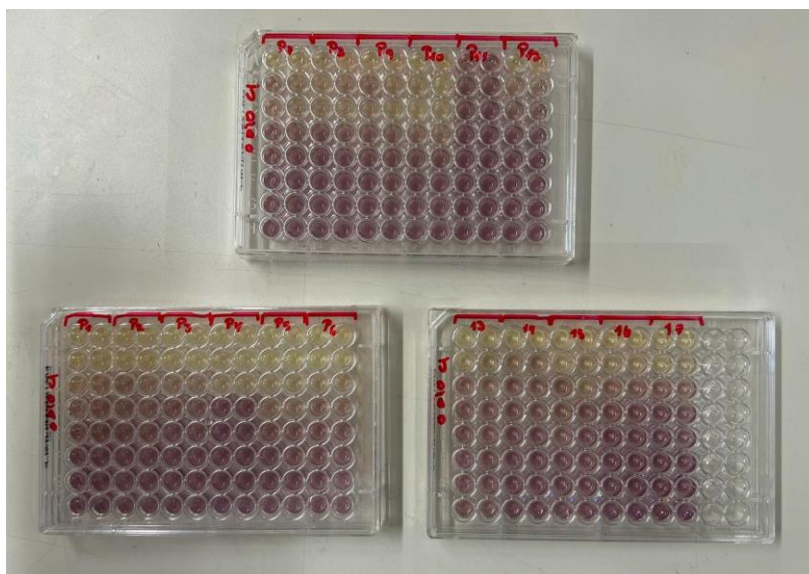


Figura 15: Microplacas para leitura do ensaio DPPH

O cálculo da capacidade antioxidante da amostra (Equação 2) foi efetuado a partir do EC₅₀, definido como a concentração de antioxidante necessária para neutralizar 50% dos radicais DPPH (Chen *et al.*, 2013).

$$\% \text{ de inibição} = \frac{A_{DPPH} - A_{extrato}}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (2)$$

4.5.1.2 Método da Inibição da Peroxidação Lipídica por Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Inicialmente, conforme descrito por Barros *et al.*, (2013), uma massa de cérebro de porco (*Sus scrofa*) foi pesada e misturada com o dobro desta massa de tampão Tris-HCl (20 mM; pH = 7,4). Após agitação, o tubo foi centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi recolhido.

O sobrenadante (100 µL) foi então misturado com extratos em diferentes concentrações (200 µL), FeSO₄ (100 µL) e ácido ascórbico (100 µL). Esta mistura foi incubada a 37 °C durante uma hora. Após a incubação, a reação foi interrompida pela

adição de 500 μL de ácido tricloroacético (28%, m/v) e 380 μL de ácido tiobarbitúrico (2%, m/v).

A mistura resultante foi aquecida a 80 $^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos e centrifugada a 3000 g por 5 minutos para remover o precipitado proteico. O Malondialdeído (MDA) presente reagiu com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um pigmento rosa conhecido como complexo malondialdeído-tiobarbitúrico (MDA)-TBA. Este complexo foi então utilizado para quantificar o nível de espécies reativas produzidas através do ácido tiobarbitúrico (**Figura 16**).



Figura 16: Placa do ensaio TBARS

A capacidade antioxidante da amostra (Equação 3) foi calculada a partir do EC_{50} , dado definido como a quantidade de antioxidante necessário para reduzir a peroxidação lipídica em 50% (Chen *et al.*, 2013).

$$\% \text{ de inibição da peroxidação lipídica} = \frac{A_{Tris} - A_{extrato}}{A_{Tris}} \times 100 \quad (3)$$

4.5.2 Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana foi determinada a partir do método colorimétrico INT (cloreto de *p*-iodonitrotetrazólico) por microdiluição, conforme descrito por Pires *et al.* (2018), a fim de avaliar a inibição do crescimento bacteriano e fúngico causado pelos extratos otimizados e pelos revestimentos comestíveis.

4.5.2.1 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi determinada usando oito bactérias alimentares, três gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) e cinco gram-negativas (*Enterobacter Cloacae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* e *Yersinia enterocolitica*).

O método consistiu na pesagem de 100 mg do extrato ou dos revestimentos comestíveis, e dissolução em 5 mL de água destilada com 5% (v/v) de Dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo uma solução de concentração 20 mg mL⁻¹ para o extrato, e de 7,2 mg mL⁻¹ para o revestimento. Numa microplaca de 96 poços (**Figura 17**) já contendo 90 µL de caldo tríptico de soja (TSB), foram adicionados 100 µL da solução. Posteriormente foram feitas diluições sucessivas, com auxílio de uma pipeta multicanal, obtendo concentrações de extrato de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 e 0,078 mg mL⁻¹, enquanto para os revestimentos as concentrações obtidas foram de 3,6; 1,8; 0,9; 0,45; 0,225; 0,1125; 0,056 e 0,028 mg mL⁻¹.

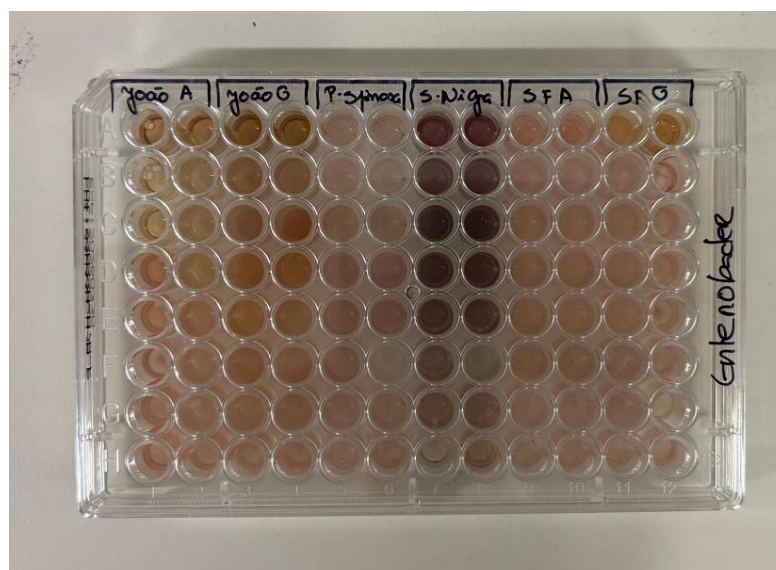


Figura 17: Placa de ensaio antimicrobiano

Com os poços contendo as diferentes concentrações do extrato, 10 µL de inóculo foi adicionado à placa antes da mesma ser incubada a 37 °C por 24 horas. Após esse período, 40 µL de INT (0,2 g L⁻¹) foi adicionado para que a placa voltasse para a incubação a 37 °C durante mais 30 minutos.

Para garantir a mesma concentração de bactéria (1×10⁵ UFC mL⁻¹) em todas as análises, os inóculos foram ajustados através do densitômetro. Os controles

negativos foram preparados utilizando meio de cultura TSB e a amostra, enquanto os positivos utilizaram os antibióticos estreptomicina, meticilina e ampicilina.

Os resultados foram avaliados a fim de determinar a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB), expressos em mg mL⁻¹ de extrato. Para segurança e precisão dos resultados, a presente análise foi realizada em duplicado, na câmara de fluxo laminar com materiais estéreis.

4.5.2.2 Atividade antifúngica

Para a determinação da atividade antifúngica, foram utilizadas duas estirpes de microfungos diferentes: *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus fumigatus*. Em solução salina estéril (0,85%) a concentração das estirpes foi ajustada, através de contagem em microscópio, para aproximadamente 1x10⁵ UFC mL⁻¹.

Numa microplaca de 96 poços, foram adicionados 90 µL de meio de cultura (malte extract) e 100 µL de extrato ou revestimento comestível os quais foram diluídos sucessivamente. Posteriormente 10 µL da suspensão fúngica é adicionada em todos os poços e a placa é incubada durante 72 horas a 25 °C.

A concentração mais baixa de extrato/revestimento que inibiu o crescimento fúngico foi definida como CMI, enquanto a menor concentração sem crescimento visível foi definida como concentração mínima fungicida (CMF). O meio de cultura foi utilizado como controlo negativo, enquanto o cetoconazol foi utilizado como controlo positivo. Os resultados de CMI e CMF foram expressos em termo de mg g⁻¹ de extrato/revestimento.

4.6 Avaliação física do revestimento

As avaliações físicas dos filmes, foram baseadas no trabalho de Carochi *et al.* (2019), a fim de determinar as modificações de textura e cor que o filme pode causar, ou inibir, num alimento revestido. Os testes ocorreram no dia de produção do revestimento e após 4 dias, sendo aplicados em maçãs.

Foram testados 2 revestimentos, um com extrato de gerânio, e o outro com extrato de alecrim (SpraySafe), mantendo constantes os outros ingredientes da produção do revestimento. As maçãs foram divididas em duas partes iguais, e cada parte foi utilizada para cada um dos tempos (dia 1 e 4), em triplicados, sendo que a

maça controlo não levou qualquer revestimento. A **Figura 18** representa a metade da maçã revestida com uma fina camada de revestimento comestível. Após a aplicação essas foram armazenadas em sala refrigerada a 5 °C.



Figura 18: Revestimento comestível aplicado sobre metade de uma maçã

4.6.1 Avaliação da textura

Com o auxílio de um texturômetro (**Figura 19**), modelo *TA.XT plus texture analyser*, da marca *Stable Micro Systems*' (Vienna Court, Godalming UK), foi realizada uma análise de perfil de textura (TPA), utilizando uma célula de carga de 30 kg com cilindro de alumínio modelo P/36R, velocidade programada para 5 mm s⁻¹ pré e pós-teste, e 3 mm s⁻¹ como velocidade de teste. O modo de observação foi definido como *strain* (deformação) até atingir 20%. Para cada amostra, o teste foi realizado em triplicado e os seus resultados foram obtidos a partir do programa *Exponent*, desenvolvido pela mesma marca do aparelho.

Em cada metade da maçã, com e sem os dois diferentes tipos de revestimento e para cada um dos tempos (dia 1 e 4), foram analisadas as diferenças de dureza, adesividade, resiliência, gomosidade, coesão, elasticidade e mastigabilidade causadas pela aplicação do revestimento.



Figura 19: Texturômetro utilizado para as análises de textura do alimento revestido

4.6.2 Avaliação da cor

A avaliação de cor foi realizada com um colorímetro portátil (**Figura 20**), modelo CR400, da marca Konica Minolta (Chiyoda, Tóquio, Japão), com indicador de iluminação D₆₅, definido pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE) como a luz do meio dia na Europa. Os três parâmetros dados pelo aparelho são capazes de indicar a cor num formato tridimensional onde L* representa a luminosidade, a* representa vermelhidão (vermelho-verde) e b* representa os tons entre amarelo e azul. As análises foram realizadas em triplicado para cada tempo.



Figura 20: Colorímetro utilizado para as análises de cor do alimento revestido

4.7 Análise Estatística

A média e o desvio padrão foram usados para expressar todos os dados desta dissertação. A otimização através do modelo de superfície de resposta foi feita recorrendo ao programa Design Expert (Stat-Ease, Inc, Minneapolis MN, EUA). No caso da análise estatística para a atividade antioxidante, foi usada uma análise de variância (ANOVA) com um teste de Tukey como *post-hoc*. Para a análise às maçãs revestidas foi realizada uma ANOVA a dois fatores utilizando somas de quadrados do tipo III para a caracterização tanto do tempo de armazenamento (TA) como do extrato (E). As duas variáveis foram tratadas como independentes neste modelo linear geral multivariado. Isso permite que os efeitos de cada variável sejam examinados separadamente e oferece mais *insights* sobre como cada elemento contribuiu para o resultado. Os gráficos de médias marginais estimadas (EMM) foram usados para tirar algumas conclusões gerais e tendências se uma interação significativa ($p > 0,05$) entre os dois componentes (TA e E) fosse observada. Se não fosse encontrada uma interação significativa ($p > 0,05$), cada componente era então categorizado independentemente usando o teste T2 de Tamhane para amostras não homocedásticas e o teste de Tukey para médias homocedásticas, no caso do TA,

enquanto que um teste T-student foi usado para classificar a variável E. O teste de Levene foi usado para avaliar a homocedasticidade de ambas as variáveis. O software SPSS, versão 25 foi utilizado para todas as análises estatísticas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização da extração

A **Tabela 2** mostra os três fatores em análise no ensaio de otimização, bem como a resposta para cada uma das 17 extrações necessárias. No caso do tempo, os três níveis definidos foram de 5, 22,5 e 40 minutos (F_1), na potência de micro-ondas foram de 150, 375 e 600 watts (F_2), e finalmente no caso do solvente foram considerados os níveis de 0, 50 e 100% de etanol (F_3). A resposta, R_1 , atividade antioxidante através do ensaio de DPPH está também representada na tabela.

Tabela 2: Condições dos ensaios e respostas para a otimização dos valores de DPPH para o extrato de *G. robertianum* L.

Ensaio	Tempo (min) F_1	Potência (Watts) F_2	EtOH (%) F_3	DPPH (EC_{50} em $\mu\text{g mL}^{-1}$) R_1
1	22,5	375	50	25,78
2	22,5	375	50	22,90
3	40	150	50	62,37
4	22,5	600	0	60,26
5	22,5	375	50	27,35
6	5	600	50	41,71
7	5	150	50	59,35
8	5	375	0	74,73
9	22,5	600	100	86,76
10	22,5	375	50	71,86
11	5	375	100	3291,89
12	40	375	100	237,97
13	40	600	50	168,05
14	22,5	150	100	236,69
15	22,5	375	50	68,66
16	22,5	150	0	67,09
17	40	375	0	63,38

Em termos de otimização, o modelo mostrou-se significativo com um “*lack of fit*” não significativo, demonstrando um R^2 de 0,9990 e um R^2 ajustado de 0,9974. O 17º ensaio foi ignorado neste modelo por se tratar de um valor aberrante (daí estar rasurado na **Tabela 2**). A Equação 4 descreve as variáveis inseridas na equação quadrática do modelo de otimização.

$$R_1 = 0,0433 + 0,0324F_1 - 0,0086F_2 + 0,0491F_3 + 0,0308F_1F_2 - 1,56F_1F_3 - 0,0358F_2F_3 + 0,8213F_1^2 - 0,7818F_2^2 + 0,8511F_3^2 \quad (4)$$

Aplicando a função minimizar, no programa Design Expert, o modelo encontrou as condições ótimas dos três fatores que minimizam a resposta (R_1), ou seja, o ponto onde há uma menor concentração necessária para neutralizar 50% dos radicais DPPH. Esse ponto foi definido por 15 minutos de tempo de extração (F_1), 545 Watts de potência (F_2) e 9% de etanol (F_3). Nestas condições, o modelo prevê uma concentração de $23 \mu\text{g mL}^{-1}$ que conseguirão neutralizar 50% dos radicais DPPH, um valor abaixo dos 17 ensaios que foram realizados (**Tabela 2**). Na **Figura 21** estão representadas essas condições.

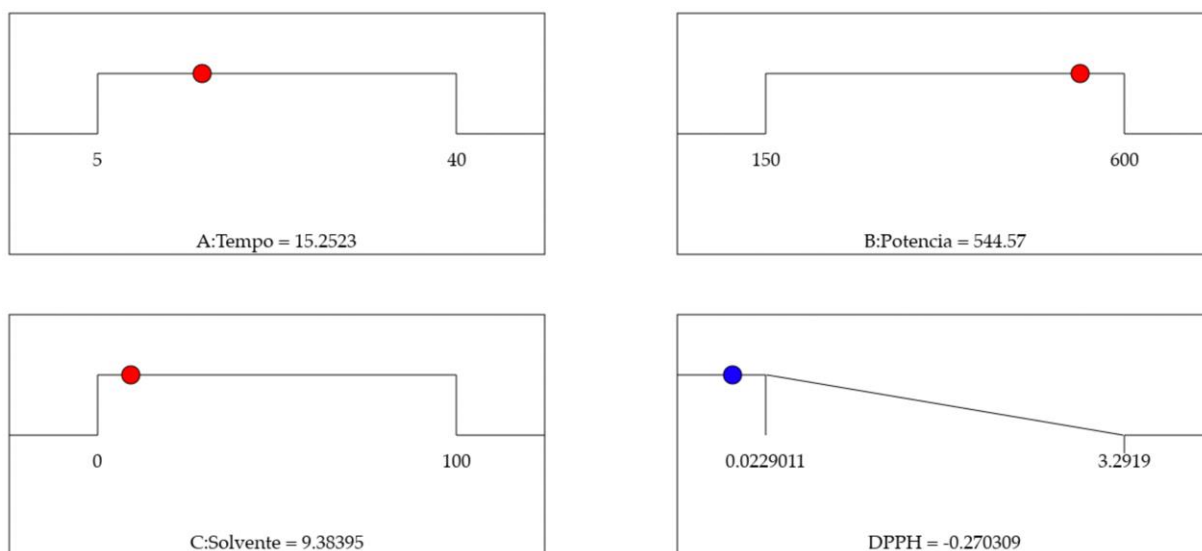


Figura 21: Representação do ponto ótimo onde a concentração mais baixa consegue neutralizar 50% dos radicais DPPH. A - Tempo (F_1), B - Potência (F_2) e C - Solvente (F_3).

Na **Figura 22** estão representados os gráficos 3D correspondentes à otimização do extrato de gerânio. Estas representações tridimensionais combinam dois fatores, mantendo o terceiro no seu ponto ótimo. Assim, na **Figura 22-A**, pode ver-se que há uma menor concentração no momento inicial da extração, sendo que a capacidade antioxidante diminui ao longo desse tempo (o valor de atividade antioxidante está representado em EC_{50} , assim, quanto menor o valor, maior a atividade antioxidante). Por outro lado, em termos de potência, os valores intermédios parecem desfavorecer a atividade antioxidante, contudo, potencias perto dos 500 watts parecem ser as mais indicadas. Na **Figura 22-B**, existe um vale central que

otimiza a atividade antioxidante, neste caso, tempos baixos voltam a demonstrar uma melhor atividade, bem como baixas concentrações de etanol. Finalmente, no caso da **Figura 22-C**, baixas concentrações de etanol mostram boa atividade antioxidante (zona azul escura), bem como altos valores de potência. Através destas figuras, em conjugação com a equação do modelo, os fatores tempo de extração e percentagem de solvente são aqueles com maior contribuição para a definição deste ponto ótimo, enquanto a potência de micro-ondas não parece ter muita relevância. Isto é particularmente notório, pois potências muito altas e muito baixas parecem ambas promover uma boa atividade antioxidante.

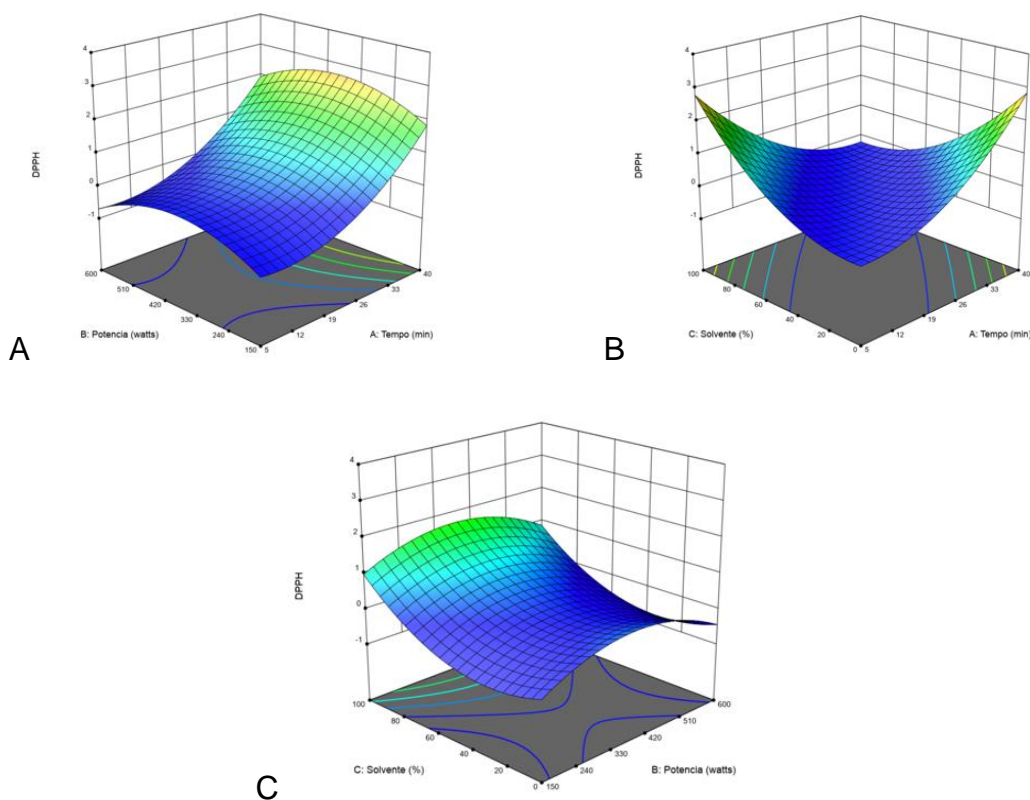


Figura 22: Representação do ponto ótimo em gráficos 3D, combinando 2 fatores em cada gráfico

5.2 Rendimento da extração

Após obter o ponto ótimo, o extrato de gerânio foi extraído nesses pontos e caracterizado. Essa extração foi feita em quadruplicado, sendo o rendimento médio obtido a partir de média aritmética, de 23,89%, com um desvio padrão de 0,629%, conforme apresentado na **Tabela 3**. O extrato resultante está apresentado pela **Figura 23**.

Tabela 3: Rendimento obtido nas extrações otimizadas de *G. robertianum*

Extração	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Rendimento (%)
1	3,005	0,704	23,428
2	2,952	0,732	24,797
3	2,991	0,722	24,139
4	3,027	0,702	23,191
Média			23,89
Desvio padrão			0,629

**Figura 23:** Extrato otimizado obtido a partir de *G. robertianum* L.

5.3 Compostos fenólicos do extrato otimizado de *G. robertianum* L.

Os compostos fenólicos foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de díodos e a um detetor de espectrometria de massa com uma fonte de ionização por electrospray (HPLC-DAD-ESI/MS). A partir de dados já descritos na literatura (Catarino *et al.*, 2017; Tuominen; Salminen, 2017; Graça *et al.*, 2017), o perfil desses compostos está apresentado na **Tabela 4**.

Tabela 4: Identificação dos compostos fenólicos do extrato otimizado de *G. robertianum* L.

Pico	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação (mg g ⁻¹ de extrato)
1	4.13	281	343	191(100),169(16)	Ácido galoilquínico	0,36 ± 0,02
2	5.81	328	353	191(100),179(15).161,135(14)	Ácido 4-O-cafeoilquínico	0,175 ± 0,004
3	6.31	338	353	191(100),179(15).161,135(14)	Ácido 5-O-cafeoilquínico	0,0817 ± 0,0001
4	7.09	332	633	497(69),301(100)	Isômero I de galoil-HHDP-glucosídeo	1,251 ± 0,003
5	7.74	338	633	497(69),301(100)	Isômero II de galoil-HHDP-glucosídeo	1,266 ± 0,003
6	9.25	320	367	193(100)	Ácido feruloilquínico	0,1008 ± 0,0004
7	10.49	289	443	273(100),191(9)	Epicatequina-3-O-galato	0,2 ± 0,01
8	11.29	280	951	907(100),605(12),301(33)	Isômero II de trisgaloil-HHDP-glucosídeo	1,482 ± 0,001
9	12.42	273	951	907(100),605(12),301(33)	Isômero I de trisgaloil-HHDP-glucosídeo	1,2302 ± 0,0012
10	13.01	345	951	933(100), 735(21),445(31),301(6)	Isômero I de galoil-HHDP-DHHDP-hexosídeo	1,221 ± 0,001
11	13.79	342	951	933(100), 735(21),445(31),301(6)	Isômero II de galoil-HHDP-DHHDP-hexosídeo	1,2105 ± 0,0007
12	14.41	345	755	609(27),301(100)	Quercetina-3-O-ramnosilrutinosídeo	0,4664 ± 0,0006
13	15.98	351	609	301(100)	Quercetina-3-O-rutinosídeo	0,466 ± 0,0003
14	16.37	338	739	593(100),55(21),327(43),285(6)	Kaempferol-O-ramnosídeo-rutinosídeo	0,4639 ± 0,0004
15	17.33	360	433	301(100)	Ácido elágico-pentosídeo	1,193 ± 0,003
16	18.29	338	475	313(100)	Kaempferol dimetiléter hexosídeo	0,4629 ± 0,0003
17	18.93	353	463	301(100)	Quercetina-3-O-glucosídeo	0,4759 ± 0,0013
18	19.47	366	301	135(100)	Ácido elágico	1,2166 ± 0,001
19	20.83	353	593	447(9),285(100)	Kaempferol-O-rutinosídeo	0,4657 ± 0,0002
20	21.42	359	577	431(100),285(25)	Kaempferol 3,7-O-dirramnosídeo	0,4642 ± 0,0002
21	22.34	353	475	313(100)	Kaempferol dimetiléter glucosídeo	0,4666 ± 0,001
Flavonóides totais						4,42 ± 0,01
Ácidos fenólicos totais						10,79 ± 0,04
Compostos fenólicos totais						14,67 ± 0,03

Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão.

Rt: tempo de retenção; λ_{\max} : Comprimento de onda de absorção máxima; [M-H]⁻: íon molecular; MS²: íon fragmentado.

Com destaque para os isómeros de galoil-HHDP-glucosídeo (picos **4** e **5**) e trisgaloil-HHDP-glucosídeo (picos **8** e **9**), os compostos predominantes da análise obtiveram 35% do total identificado e possuem espectros $[M-H]^-$ a m/z 633 e 951, respectivamente. Os compostos com um grupo galoil foram anteriormente encontrados no trabalho de Graça *et al.* (2017); entretanto, aqueles que apresentam três grupos galoil só foram encontrados noutras espécies de *Geranium* (Tuominen; Salminen, 2017). Segundo Baratto *et al.* (2009), a superioridade de grupos galoil na molécula indica maiores bioatividades, confirmando as qualidades antioxidantes e antimicrobianas da substância.

Outros grupos galoil (picos **10** e **11**) também foram encontrados em quantidades significativas ($\sim 1,2 \text{ mg g}^{-1}$ de extrato). Esses compostos, que apresentam o mesmo $[M-H]^-$ a m/z 951 dos picos acima citados (picos **8** e **9**), mas apresentam absorções e fragmentações diferentes, ainda não foram identificados, nesta espécie ou noutras espécies de *Geranium*. Entretanto são encontrados em frutas como a romã (Yisimayili *et al.*, 2019) e piquiá (Roxo *et al.*, 2020).

O ácido elágico ($[M-H]^-$ a m/z 301) e ácido elágico-pentosídeo ($[M-H]^-$ a m/z 433), picos **18** e **15**, atribuídos a diversos benefícios à saúde (Espín *et al.*, 2013), são encontrados com facilidade em estudos da presente extração, usualmente em grande quantidade (Catarino *et al.*, 2017; Neagu *et al.*, 2017; Paun *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2013). Outro ácido encontrado foi o ácido galoiquínico (pico **1**), com $[M-H]^-$ a m/z 343, também identificado por Catarino *et al.* (2017) na sua extração aquosa.

Cinco compostos derivados do kaempferol foram identificadas (picos **14**, **16**, **19**, **20**, **21**), sendo eles Kaempferol-*O*-ramnosídeo-rutinosídeo ($[M-H]^-$ a m/z 739), Kaempferol dimetiléter hexosídeo ($[M-H]^-$ a m/z 475), Kaempferol-*O*-rutinosídeo ($[M-H]^-$ a m/z 353), Kaempferol 3,7-*O*-dirramnosídeo ($[M-H]^-$ a m/z 359) e Kaempferol dimetiléter glucosídeo ($[M-H]^-$ a m/z 353), todos em quantidades próximas a $0,46 \text{ mg g}^{-1}$ de extrato. As derivações desses flavonóides são apresentadas em diferentes estudos, e estão presentes, na espécie *robertianum* e noutras diferentes espécies da família *Geranium* (Graça *et al.*, 2017; Graça *et al.*, 2016; Bate-Smith, 1962; Ivancheva; Petrova, 2000). O kaempferol e suas variações já provaram ter ótimas atividades antioxidantes (Ibrahim *et al.*, 2021), anti-inflamatórias (Khajuria *et al.*, 2018), além de diversos benefícios a saúde (Sharma *et al.*, 2020; Melek *et al.*, 2021).

Os outros flavonóides encontrados em grande quantidade ($\sim 0,47 \text{ mg g}^{-1}$ de extrato) são os derivados de quercetina (picos **12**, **13** e **17**). Estes compostos já foram

encontrados em diferentes extrações de *G. robertianum* L., com o uso de metanol (Ivancheva; Petrova, 2000), água (Paun *et al.*, 2014; Neagu *et al.*, 2013), etanol/água (Paun *et al.*, 2012; Fodorea *et al.*, 2005) e acetato de etilo (Kobakhidze; Alaniya, 2004).

Entre os compostos encontrados em baixa quantidade (abaixo de 0,2 mg g⁻¹) estão os ácidos 4-*O*-cafeoilquínico ([M-H]⁻ a *m/z* 353), 5-*O*-cafeoilquínico ([M-H]⁻ a *m/z* 353), feruloilquínico ([M-H]⁻ a *m/z* 367) e o flavonóide epicatequina-3-*O*-galato ([M-H]⁻ a *m/z* 443) (picos **2**, **3**, **6** e **7**), sendo os últimos dois encontrados pela primeira vez na família *Geranium*.

Totalizando 14,67 mg g⁻¹ de compostos fenólicos identificados, a presente extração apresentou quantidades superiores a extração hidroetanólica de Neagu *et al.* (2009), na qual identificou apenas 4,21 mg g⁻¹. Stanković *et al.* (2024) implementaram um processo de otimização, visando a máxima obtenção de compostos fenólicos, onde com uso de etanol foi capaz de identificar 20 compostos, totalizando 120,44 mg g⁻¹.

5.4 Avaliação das bioatividades

5.4.1 Atividade antioxidante

As avaliações da atividade antioxidante do extrato otimizado, assim como dos dois revestimentos comestíveis, foram realizadas através do ensaio de DPPH, avaliando o efeito captador do radical livre da substância 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, e do ensaio de TBARS, baseado na inibição da peroxidação lipídica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Os resultados de ambas estão apresentados na **Tabela 5** em termos de valores de EC₅₀, valor que representa a concentração de amostra que fornece 50% de atividade antioxidante. Tendo em conta que a atividade é maior conforme menor for a concentração necessária para inibir 50% da oxidação, o menor valor de EC₅₀ representa maior a atividade antioxidante.

Tabela 5: Resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante para o extrato de *Geranium robertianum* L. e o revestimento comestível

	EC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	
	DPPH	TBARS
Extrato de <i>G. robertianum</i> L.	5,35 ± 0,05	8,76 ± 0,11
Revestimento com <i>G. robertianum</i> L.	30,26 ± 1,59*	20,84 ± 1,36*
Revestimento com <i>R. officinalis</i> L.	54,44 ± 5,40	89,34 ± 2,46

Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão. Um asterisco representa uma diferença significativa, com uma significância de 0.05.

O extrato otimizado de *G. robertianum* L. obteve ótimo resultado na sua análise de DPPH (EC₅₀ de 5,35 µg mL⁻¹) quando comparado aos 17 ensaios iniciais, realizados para obtenção dos parâmetros de otimização. Neste primeiro momento, o melhor dos resultados atingiu apenas 25% do poder antioxidante (EC₅₀ de 22,90 µg mL⁻¹) da presente análise. Em comparação com outros estudos, o extrato otimizado obtido se destaca novamente em termos de DPPH. Os extratos metanólicos de Nikolova *et al.* (2010) e Ben Jemia *et al.* (2013), assim como o extrato etanólico de Catarino (2015), obtiveram, respectivamente, EC₅₀ de 14,93 µg mL⁻¹, 19,98 µg mL⁻¹ e 7,6 µg mL⁻¹.

No método de TBARS o extrato de *G. robertianum* L. (EC₅₀ de 8,76 µg mL⁻¹) também obteve destaque quando comparado a extração etanólica de Catarino (2015) (115,8 µg mL⁻¹), e com valores muito semelhantes à Graça *et al.* (2016) nos seus ensaios aquosos (7,24 µg mL⁻¹), metanólicos (11 µg mL⁻¹) e com n-hexano (24 µg mL⁻¹), entretanto, valores superiores foram encontrados quando utilizado acetona como solvente (0,36 µg mL⁻¹).

O revestimento com extrato de *G. robertianum* L. apresentou resultados satisfatórios no ensaio de DPPH (EC₅₀ de 30,26 µg mL⁻¹) e TBARS (EC₅₀ de 20,84 µg mL⁻¹) quando comparado aos ensaios realizados com *R. officinalis*. No estudo de Sedaki (2021), onde o SpraySafe com extrato de alecrim foi analisado, os resultados de TBARS e DPPH foram respectivamente 54,62 µg mL⁻¹ e 71,84 µg mL⁻¹, resultados próximos ao obtido no presente trabalho (EC₅₀ de 89,34 µg mL⁻¹ e EC₅₀ de 54,44 µg mL⁻¹, respectivamente).

Surpreendentemente, o revestimento obteve resultados inferiores ao do extrato. Estes resultados estão de acordo com Sedaki (2021), em que os compostos da formulação, quando separados, apresentaram melhores atividades antioxidantes que quando misturados, principalmente tratando-se do extrato de *R. officinalis* com o

ácido ascórbico. Isso sugere que as interações entre os componentes pode influenciar a sua eficácia de forma imprevisível, podendo haver sinergias ou antagonismos entre eles. Segundo Asadi-Samani *et al.* (2019) e Bouayed; Bohn (2010), diferentes compostos antioxidantes, quando unidos, podem interferir entre si uma vez que seu tipo, dosagem e matrizes podem impactar o equilíbrio entre resultados benéficos (antioxidante) ou prejudiciais (pró-oxidantes).

5.4.2 Atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método colorimétrico através de microdiluições, enquanto a atividade antifúngica foi avaliada por visualização microscópica da formação de esporos. A **Tabela 6** apresenta os resultados destes ensaios, em CMI, para o extrato, revestimento, assim como para alguns antibióticos utilizados como controlo positivo para bactérias (estreptomicina, meticilina e ampicilina) e fungos (cetoconazol). O extrato e os revestimentos não apresentaram valores de CMB e CMF.

O extrato de *G. robertianum* L., assim como os dois revestimentos comestíveis, apresentaram atividades para todas as bactérias gram-negativas (*Enterobacter Cloacae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* e *Yersinia enterocolitica*) e gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) assim como para os dois fungos (*Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus fumigatus*) avaliados.

Os revestimentos comestíveis destacam-se nas atividades antimicrobianas quando comparado ao extrato de *G. robertianum* L., com exceção aos resultados da bactéria *Listeria monocytogenes*. Entre os dois revestimentos, os resultados são muito semelhantes, entretanto o revestimento incorporado com *R. officinalis* mostrou-se levemente mais eficaz contra *Enterobacter cloacae*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica*.

Tabela 6: Resultados da atividade antimicrobiana do extrato de *Geranium robertianum* L. e dos revestimentos comestíveis

	CMI (mg mL ⁻¹)						
	Extrato de <i>G. robertianum</i> L.	Revestimento comestível com <i>G. robertianum</i> L.	Revestimento comestível com <i>R. officinalis</i> L.	Controlo Positivo			
				Estreptomicina 1mg mL ⁻¹	Meticilina 1mg mL ⁻¹	Ampicilina 10mg mL ⁻¹	Cetoconazol 1mg mL ⁻¹
Bac. Gram-negativas							
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	3,6	1,8	0,007	N/A	0,15	N/A
<i>Escherichia coli</i>	10	3,6	3,6	0,01	N/A	0,15	N/A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	3,6	3,6	0,06	N/A	0,63	N/A
<i>Salmonella enterica</i>	10	3,6	0,9	0,007	N/A	0,15	N/A
<i>Yersinia enterocolitica</i>	10	3,6	3,6	0,007	N/A	0,15	N/A
Bac. Gram-positivas							
<i>Bacillus cereus</i>	10	3,6	3,6	0,007	N/A	N/A	N/A
<i>Listeria monocytogenes</i>	1,25	1,8	0,9	0,007	N/A	0,15	N/A
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	3,6	3,6	0,007	0,007	0,15	N/A
Fungos							
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	5	3,6	3,6	N/A	N/A	N/A	0,06
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10	3,6	3,6	N/A	N/A	N/A	0,5

Bac.: Bactérias, CMI: Concentração Mínima Inibitória; N/A: não avaliado

Através de uma EAU hidroetanólica otimizada de *G. robertianum* L., Stanković *et al.* (2024) obtiveram CMI's semelhantes ao obtido no presente trabalho para as bactérias *Escherichia coli* (10 mg mL⁻¹), *Pseudomonas aeruginosa* (20 mg mL⁻¹), *Salmonella entérica* (10 mg mL⁻¹) e *Bacillus cereus* (5 mg mL⁻¹). Já no trabalho de Ilić *et al.* (2021), as bactérias estudadas, que coincidem com o presente trabalho (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*s), também apresentaram atividades antibacterianas para o extrato metanólico de *G. robertianum* L., porém apresentaram CMI's consideravelmente menores (0,1, 0,05 e 0,1 mg mL⁻¹, respetivamente), o que sugere variação quando aplicado diferentes solventes.

Para Radulovic *et al.* (2012), onde as atividades antimicrobianas foram determinadas através do óleo essencial da planta de *Geranium*, os mesmos resultados foram obtidos para as bactérias *Staphylococcus aureus* (10 mg mL⁻¹) e *Escherichia coli* (10 mg mL⁻¹), enquanto que para o fungo *Aspergillus fumigatus*, o resultado se mostrou muito mais eficaz para o óleo (0,312 mg mL⁻¹) quando comparado ao extrato (5 mg mL⁻¹).

Através de quatro diferentes solventes (metanol, água, hexano e etil acetato), Świątek *et al.* (2023) determinaram as atividades antimicrobianas para diferentes bactérias. O extrato aquoso da planta obteve resultados semelhantes aos obtidos na **Tabela 6**, tanto para as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (ambas com CMI de 4 mg mL⁻¹), quanto para as gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (ambas com CMI de 8 mg mL⁻¹). Os restantes solventes destacaram-se neste estudo com CMI's entre 0,03 e 2 mg mL⁻¹ para as bactérias gram-positivas, embora tivessem apresentado resultados baixos ou nulos (>8 mg mL⁻¹) para as seis bactérias gram-negativas testadas.

Além dos microrganismos testados, diferentes estudos também apresentaram atividades de *G. robertianum* L. para as bactérias, gram-positivas: *Clostridium sporogenes*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus flavus*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus epidermidis*; gram-negativas: *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus vulgaris*; e fungos: *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus restrictus*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*. (Radulovic *et al.*, 2012; Alhage & Elbitar, 2019; Świątek *et al.*, 2023).

Uma análise alternativa foi utilizada por Sedaki (2021) para verificar as atividades antimicrobianas do revestimento comestível formado com extrato de *R. officinalis*. Os resultados obtidos, que vão de acordo com a **Tabela 6**, determinaram a inibição de crescimento para *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* assim como para o

fungo *Aspergillus parasiticus*. No entanto, para o fungo *Zygosaccharomyces rouxii*, o revestimento não demonstrou capacidade de inibir o crescimento mesmo no primeiro dia de contato.

5.5 Avaliação física do revestimento

As análises de textura e cor foram realizadas a fim de comparar as modificações que o revestimento causa no alimento. A **Figura 24** apresenta o Spraysafe (revestimento patenteado desenvolvido com extrato de alecrim) em comparação com o revestimento comestível desenvolvido com extrato de *G. robertianum* L. A olho nu, é perceptível a diferença de cor entre as duas soluções de revestimento.



Figura 24: Revestimentos comestíveis obtidos a partir de *R. Officinalis* L. (esquerda) e *G. robertianum* L. (direita)

A **Tabela 7** apresenta os valores de cor do interior das maçãs, representado pela escala CieLAB (L^* , a^* e b^*) ao longo dos 4 dias de armazenamento, bem como as diferentes dimensões da textura, resultantes de um teste de TPA (Texture Profile Analysis). A tabela está dividida em duas secções, uma correspondente ao Tempo de Armazenamento (TA) e outra ao extrato usado na solução de revestimento (E), que correspondem aos dois fatores em estudo nesta análise de variância, sendo o controle a maçã sem revestimento, o alecrim e o gerânio os revestimentos incorporados com extrato de *G. robertianum* L. e *R. officinalis* L. respetivamente.

Tabela 7: Cor externa e textura das maçãs tratadas com os revestimentos ao longo de 4 dias de armazenamento.

		Cor			Textura						
		L*	a*	b*	Dureza (g)	Adesividade (g.sec)	Elasticidade (%)	Coesividade (%)	Gomosidade (g)	Mastigabilidade	Resiliência (%)
Tempo Armazenamento (TA)	0 dias	74±4	0±2*	30±5*	18376±3125*	-21±18	0,71±0,08	0,51±0,04	9088±1490	6520±1433	0,31±0,003
	4 dias	62±10	8±4	40±9	16792±2691	-113±38	0,7±0,1	0,50±0,04	8649±1503	5890±463	0,31±0,03
p-value (n=6)	ANOVA	<0,001	<0,001	<0,001	0,005	<0,001	0,453	0,544	0,144	0,162	0,644
Extrato (E)	Controlo	77±3 ^c	0±2 ^a	27±4 ^a	19303±2014 ^b	-79±78	0,63±0,04 ^a	0,46±0,02 ^a	9373±463 ^b	6013±631 ^{a, b}	0,287±0,008 ^a
	Alecrim	67±2 ^b	5±2 ^b	37±4 ^b	19462±1199 ^b	-62±57	0,68±0,08 ^a	0,54±0,04 ^b	10175±820 ^b	7045±1460 ^b	0,33±0,03 ^b
	Gerânio	59±3 ^a	6±3 ^b	41±6 ^b	13987±818 ^a	-60±27	0,79±0,04 ^b	0,51±0,03 ^b	7058±409 ^a	5557±250 ^a	0,32±0,01 ^{a, b}
p-value (n=9)	ANOVA	<0,001	0,003	<0,001	<0,001	0,165	<0,001	0,004	<0,001	0,039	0,029
TA x E (n=18)	p-value	0,544	0,262	0,115	0,037	0,001	0,2	0,824	0,797	0,418	0,442

Para o tempo de armazenamento (TA), um asterisco depois do desvio padrão representa uma diferença significativa com uma significância de 0,05, enquanto letras diferentes ao lado do desvio padrão nas linhas do extrato (E) representam uma diferença significativa com uma significância de 0,05

Os valores de desvio padrão podem parecer muito grandes, contudo eles não correspondem a uma medida de precisão, mas sim às diferentes condições em que cada fator foi avaliado. Assim, todos os tipos de extrato estão representados em cada uma das linhas do TA, e todos os tempos de armazenamento estão incluídos nas três linhas do E. Esta ANOVA a dois fatores permite perceber qual dos dois fatores contribui mais para os resultados obtidos, já que ambos influenciam os valores. Assim, caso não se verifique uma interação significativa dos dois fatores ($TA \times E > 0.05$), cada um dos fatores é analisado e classificado independentemente (TA classificado com teste t-student, E classificado com Tukey ou Tahmane T2). No caso de existir uma interação significativa ($TA \times E < 0.05$), não se classifica cada fator individualmente e apenas se tiram tendências pelas médias marginais estimadas ou pelos “*partial eta squared*” que representam o tamanho do efeito de cada um dos fatores na variância obtida.

Pela **Tabela 7**, pode-se perceber que no caso da cor, a luminosidade (L^*) não sofreu diferenças significativas ao longo do tempo, mas, no caso dos revestimentos, o incorporado com gerânio apresentou a menor luminosidade, seguido do alecrim, sendo o controlo o mais claro. Já no caso da coordenada a^* (vermelho-verde), houve diferenças significativas entre os dois tempos de armazenamento, com um deslocamento para o vermelho. Para os revestimentos, as intensidades mais vermelhas foram registadas, sendo o mais verde, a maçã controlo. Finalmente, no caso da coordenada b^* , (azul-amarelo), houve um amarelecimento significativo de T0 para T4 em todas as amostras. Assim, importa perceber como se comportaram as soluções de revestimento relativamente a esta coordenada, e fica claro que houve um amarelecimento significativo nas amostras com gerânio e alecrim. Estes valores eram esperados já que as maçãs controlo não levaram qualquer revestimento, e por mínimo que seja, há sempre uma pequena alteração de cor. Os valores foram significativamente diferentes porque os desvios são muito pequenos, mas não representam uma alteração de cor muito grande como se pode ver na **Figura 25**.



Figura 25: Revestimento comestível de *G. robertianum* aplicado sobre a maçã nos dias 1(esquerda) e 4(direita)

Importa referir que o aspeto do revestimento é ainda uma investigação em curso, pois ainda se está a otimizar a fluidez do revestimento e a remoção ao máximo da cor. Neste trabalho, o grande objetivo era comparar os dois revestimentos, sobretudo em termos antioxidantes.

Relativamente à textura, foram obtidos resultados para sete diferentes dimensões: dureza, adesividade, coesividade, elasticidade, gomosidade, mastigabilidade e resiliência a partir da TPA. A dureza representa a força que os dentes devem aplicar sobre o alimento; a adesividade indica a capacidade que o alimento tem de aderir aos dentes durante a mastigação e é expresso em valores negativos devido à força de medição aplicada na fase ascendente da análise no texturómetro; a coesividade representa a capacidade de suportar uma segunda deformação em relação a resistência à primeira deformação aplicada; a elasticidade é definida como a taxa na qual o alimento reverte seu estado deformado novamente para o estado original, após a aplicação e remoção da força; a gomosidade é o produto da dureza pela coesividade, e representa a energia necessária para mastigar um alimento; a mastigabilidade, multiplicação entre adesividade, coesividade e elasticidade, indica a energia necessária para mastigar o alimento até que esteja pronto para ser engolido (adimensional); enquanto a resiliência, análise semelhante a elasticidade, entretanto, com medidas de velocidade e força para recuperar seu formato original (Carocho *et al.*, 2020).

Há uma redução significativa da dureza das maçãs do primeiro para o último dia, ainda que a maçã com revestimento de *G. robertianum* L. seja a que mais

amoleceu, já que não há diferença significativa entre o controlo e a maçã com revestimento de alecrim.

No caso da adesividade, houve uma interação significativa entre os dois fatores, e algumas tendências foram obtidas pelas médias marginais estimadas (**Figura 26**). Na figura pode ver-se que há maior adesividade em T4 (adesividade é medida em valores negativos) que em T0, e que as maçãs mais adesivas sejam as que foram revestidas.

Para as análises de coesividade, gomosidade, mastigabilidade e resiliência não foram encontradas diferenças significativas entre T0 e T4, apenas entre os tipos de revestimento. Assim, no caso da coesividade, houve uma maior coesividade nas maçãs com revestimento. Inversamente, no caso da gomosidade, o revestimento com *G. robertianum* L. apresentou menor gomosidade do que a maçã controlo e revestida com alecrim, mostrando que esta não ficou tão gomosa (mole), funcionando este extrato como um protetor da integridade estrutural da mesma. A mastigabilidade mais baixa foi detetada para a maçã protegida com *G. robertianum* L., e maior para o controlo, mostrando diferenças significativas entre si, enquanto a maçã revestida com alecrim não mostrou diferenças significativas para com as outras duas. Finalmente no caso da resiliência, as diferenças significativas foram registadas entre o controlo e a maçã protegida com alecrim, sendo a maçã controlo, a menos resiliente.

A textura mostra que os revestimentos obviamente alteram pequenas propriedades da maçã, mas a sua estrutura mantêm-se intacta, podendo ainda ser consumida. Entre os dois extratos, há pequenas variações nas dimensões em que atuam, mas ambos parecem manter a integridade das maçãs. Faltam estudos futuros mais específicos para melhorar estas soluções de revestimento. Ainda assim, 4 dias são muitas horas de exposição do interior de uma maçã aos elementos, e importa fazer análise em tempos mais curtos, onde os revestimentos conseguem realmente evitar o escurecimento do interior (formação de quinonas) sem alterar as estruturas do resto da maçã.

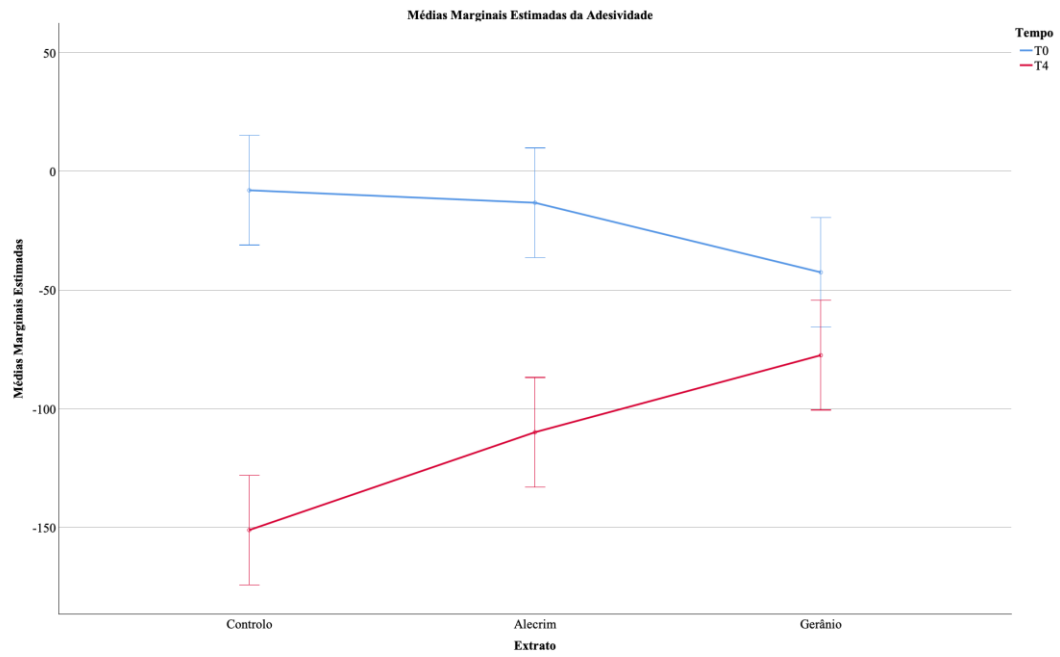


Figura 26: Média marginal estimada para a adesividade.

6. CONCLUSÃO

Com a crescente demanda pela substituição do plástico convencional, uma técnica de revestimento comestível patenteada, apresentou destaque na manutenção de alimentos, entretanto com baixas potências antioxidantes. Dessa forma, o presente trabalho apresentou com sucesso novas fontes bioativas para ser implementadas nessa tecnologia.

A otimização dos parâmetros de EAM da planta de *G. robertianum*, com 15 minutos de tempo de extração, 545 Watts de potência e 9% de etanol, possibilitaram a obtenção de um extrato com atividades antioxidantes promissoras, sendo o obtido, o que apresentou melhores resultados nas análises de DPPH (EC_{50} de $5,35 \mu\text{g mL}^{-1}$) e TBARS (EC_{50} de $8,76 \mu\text{g mL}^{-1}$), quando comparado a outras extrações hidroetanólicas de *G. robertianum* L. encontrados na literatura.

Os 21 compostos fenólicos identificados a partir de HPLC-DAD-ESI-MS/MS do extrato ótimo, totalizaram $14,67 \text{ mg g}^{-1}$ de extrato. Entre os mais presentes estão os isômeros de galoil-HHDP-glucosídeo e trisgaloil-HHDP-glucosídeo, assim como os compostos derivados do Kaempferol, do ácido elágico e da quercetina.

O extrato também apresentou boas respostas antibacterianas e antifúngicas para três bactérias gram-positivas diferentes (CMI entre 5 e 10 mg mL^{-1}), cinco gram-negativas (CMI entre 1,25 e 10 mg mL^{-1}) além dos dois fungos (CMI entre 5 e 10 mg mL^{-1}), com destaque contra *Enterobacter cloacae*, *Listeria monocytogenes* e *Aspergillus brasiliensis*, com CMIs, respectivamente, de 5, 5 e $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$.

Os revestimentos comestíveis apresentaram menor capacidade antioxidante quando comparado ao extrato de *G. robertianum* L., entretanto, com maior ação antimicrobiana. O revestimento incorporado com alecrim (*R. officinalis*), apresentou resultados inferiores nos ensaios de DPPH (EC_{50} de $54,44 \mu\text{g mL}^{-1}$) e TBARS ($89,34 \mu\text{g mL}^{-1}$) quando comparado ao incorporado com gerânio ($30,26$ e $20,84 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Os resultados das propriedades antimicrobianas para os dois revestimentos foram semelhantes para quase todas as bactérias e fungos investigados, com CMIs iguais ou próximas a $3,6 \text{ mg mL}^{-1}$. Destacando-se o revestimento com extrato de alecrim para as bactérias *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes* (CMIs de $0,9 \text{ mg mL}^{-1}$)

Os parâmetros físicos do revestimento, aplicado às maçãs, demonstraram eficácia na manutenção da cor durante quatro dias. No entanto, uma pequena

alteração inicial ocorre no momento da aplicação, relacionado a cor de cada extrato incorporado. Entre os diferentes parâmetros de textura analisados, a adesividade e a coesividade mostraram-se maiores nas maçãs revestidas do que na maçã usada como controlo, ao longo dos 4 dias de avaliação, enquanto, o revestimento com *G. robertianum* L. manteve as características de gomosidade mais próximas do valor registado para o controlo. Pode-se afirmar que há uma leve modificação na textura do alimento, embora a sua estrutura e integridade permaneçam intactas.

Desta forma, pode-se concluir que não há diferenças significativas entre os revestimentos nas manutenções de cor e textura quando aplicados a um alimento, assim como na capacidade antimicrobiana. Entretanto, o revestimento incorporado com *G. robertianum* L. apresenta um maior potencial antioxidante que aquele incorporado com *R. officinalis* L.

Como perspectiva futuras, o estudo de cada composto formador do revestimento comestível, em conjunto com o extrato de *G. robertianum* L. de forma individual, ajudaria a entender as alterações antioxidantes imprevistas que ocorreram no presente trabalho.

Mesmo que o extrato de *G. robertianum* L. se mostre muito eficaz, as alterações de cor causadas pela sua implementação no revestimento pode tornar o alimento por ele revestido pouco atraente para consumidores. Dessa forma, o revestimento realizado pode ter o seu uso restrito a alimentos de cor mais escura. Em trabalhos futuros, seria interessante a procura de métodos de extração e/ou solventes que reduzissem a forte cor do extrato, diminuindo, dessa forma, a cor do revestimento.

REFERÊNCIAS

- Abreu, R.M.V., Ferreira, I.C.F.R., Calhelha, R.C., Lima, R.T., Vasconcelos, M.H., Adegas, F., Chaves, R. & Queiroz, M.J.R.P. (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2-carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 46, 5800-5806.
- Aditivos & Ingredientes (2016). Carragenas. Disponível em: http://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201602/2016020229627001454324315.pdf. Acesso em: 15 de maio de 2023.
- Aedo, C. (2014). Novas ocorrências de *Geranium L.* para a flora do Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, 69(1), 221-223.
- Ananey-Obiri, D., Matthews, L., Azahrani, M. H., Ibrahim, S. A., Galanakis, C. M., & Tahergorabi, R. (2018). Application of protein-based edible coatings for fat uptake reduction in deep-fat fried foods with an emphasis on muscle food proteins. **Trends in Food Science & Technology**, 80, 167-174.
- Asadi-Samani, M., Farkhad, N. K., Mahmoudian-Sani, M. R., & Shirzad, H. (2019). Antioxidants as a double-edged sword in the treatment of cancer. **Antioxidants**.
- Ávila, M. B., de Lúcio, J. A. G., Mendoza, N. V., González, C. V., De la O Arciniega, M., & Vargas, G. A. (2013). *Geranium* species as antioxidants. **Oxidative stress and chronic degenerative diseases-A role for Antioxidants**, 113-129.
- Azeredo, H. M., & Waldron, K. W. (2016). Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact—A review. **Trends in Food Science & Technology**, 52, 109-122.
- Bagade, S. B., & Patil, M. (2021). Recent advances in microwave assisted extraction of bioactive compounds from complex herbal samples: a review. **Critical reviews in analytical chemistry**, 51(2), 138-149.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, 46(2), 446-475.
- Baratto, M. C., Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Romani, A., Visioli, F., ... Pogni, R. (2003). Antioxidant Activity of Galloyl Quinic Derivatives Isolated from *P. lentiscus* Leaves. **Free Radical Research**, 37(4), 405–412.
- Barros, L., Pereira, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2013). Optimized analysis of organic acids in edible mushrooms from Portugal by ultra-fast liquid chromatography and photodiode array detection. **Food Analytical Methods**, 6, 309–316.
- Bate-Smith, E.C. (1962). The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. I. Dicotyledons. **Journal of Linn. Soc. (Bot.)**, 58, 95–173.

Belwal, T., Chemat, F., Venskutonis, P. R., Cravotto, G., Jaiswal, D. K., Bhatt, I. D., ... & Luo, Z. (2020). Recent advances in scaling-up of non-conventional extraction techniques: Learning from successes and failures. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**.

Ben Jemia, M., Aidi Wannas, W., Ouchikh, O., Bruno, M., & Kchouk, M. E. (2013). Antioxidant activity of Tunisian *Geranium robertianum* L. (Geraniaceae). **Natural Product Research**, 27(22), 2076-2083.

Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., & Oliveira, M. B. P. P. (2016) Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb.f.: An underexploited and highly disseminated species. **Industrial Crops and Products**, 89, p. 45–51.

Bhardwaj, A., Alam, T., & Talwar, N. (2019). Recent advances in active packaging of agrifood products: A review. **Journal of Postharvest Technology**, 7(1), 33–62.

Borrelle, S.B.; Ringma, J.; Law, K.L.; Monnahan, C.C.; Lebreton, L.; McGivern, A.; Murphy, E.; Jambeck, J.; Leonard, G.H.; Rochman, C.M. (2020) Mitigate Plastic Pollution. **Science**, 1518, 1515–1518.

Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 3, 228-237.

Cardeñosa, V., Barreira, J., Barros, L., Arenas-Arenas, F., Moreno-Rojas, J., & Ferreira, I. (2015). Variety and Harvesting Season Effects on Antioxidant Activity and Vitamins Content of *Citrus sinensis* Macfad. **Molecules**, 20(5), 8287–8302.

Carocho, M., Heleno, S., Rodrigues, P., Barreiro, M. F., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2019). A novel natural coating for food preservation: Effectiveness on microbial growth and physicochemical parameters. **LWT**, 104, 76-83.

Carocho, M., Morales, P., Ciudad-Mulero, M., Fernandez-Ruiz, V., Ferreira, E., Heleno, S., ... & Ferreira, I. C. (2020). Comparison of different bread types: Chemical and physical parameters. **Food chemistry**, 310, 125954.

Catarino, M. D. (2015). Phenolic characterization and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory properties of *Eriocephalus africanus* and *Geranium robertianum* extracts (Master's thesis).

Catarino, M. D., Silva, A. M., Cruz, M. T., & Cardoso, S. M. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Geranium robertianum* L. decoctions. **Food & function**, 8(9), 3355-3365.

Castro, M. D. L., Garcia-Ayuso, L. E. (1998) Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, n. 369, p. 1– 10.

Chanioti, S.; Tzia, C. (2017) Optimization of ultrasound-assisted extraction of oil from olive pomace using response surface technology: Oil recovery, unsaponifiable matter, total phenol content and antioxidant activity. **LWT**, v. 79, p. 178-189.

Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 41, 357-377.

Chen, Z.; Bertin, R.; Frolidi, G. (2013). EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. **Food Chemistry**, 138(1), 414-420.

Costa M.J, Maciel LC, Teixeira JA, Vicente AA, Cerqueira MA. (2018) Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges. **Food research International**, 107: 84-92.

Cravotto G.; Boffa, L.; Mantegna, S.; Perego, P.; Avogadro, M.; Cintas, P. (2008) Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, p. 898-902.

De Jussie, A.L. (2010). Plant Systematics - an Integrated Approach, 3rd ed. **Science Publishers**, Enfield, NH, USA, pp. 561–563.

de la Fuente, B., Pinela, J., Mandim, F., Heleno, S.A., Ferreira, I.C.F.R., Barba, F.J., Berrada, H., Caleja, C., Barros, L. (2022). Nutritional and bioactive oils from salmon (*Salmo salar*) side streams obtained by Soxhlet and optimized microwave-assisted extraction. **Food Chemistry**, 386.

de Sá, I. S., Peron, A. P., Leimann, F. V., Bressan, G. N., Krum, B. N., Fachinetto, R., ... & Ineu, R. P. (2019). In vitro and in vivo evaluation of enzymatic and antioxidant activity, cytotoxicity and genotoxicity of curcumin-loaded solid dispersions. **Food and Chemical Toxicology**, 125, 29-37.

Dehghani, S., Hosseini, S. V., & Regenstein, J. M. (2018). Edible films and coatings in seafood preservation: A review. **Food Chemistry**, 240(1), 505-513

Dong, F., & Wang, X. (2017). Effects of carboxymethyl cellulose incorporated with garlic essential oil composite coatings for improving quality of strawberries. **International Journal of Biological Macromolecules**, 104, 821–826.

Dul, M., Paluch, K. J., Kelly, H., Healy, A. M., Sasse, A., & Tajber, L. (2015). Self-assembled carrageenan/protamine polyelectrolyte nanoplexes—Investigation of critical parameters governing their formation and characteristics. **Carbohydrate polymers**, 123, 339-349.

Esfandani-Bozchaloyi, S., Sheidai, M., Keshavarzi, M. and Noormohammadi, Z. (2018): Species identification and population structure analysis in Geranium subg. Geranium (Geraniaceae). **Hacquetia** 17(2), 235–246.

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

Fernandes, F. A., Pedrosa, M. C., Ueda, J. M., Ferreira, E., Rodrigues, P., Heleno, S. A., ... & Barros, L. (2022). Improving the physicochemical properties of a traditional Portuguese cake—"económicos" with chestnut flour. **Food & Function**, 13(15), 8243-8253.

Fodorea, C.S., Vlase, L., Suciú, S., Tamas, M., Leucuta, S.E. (2005). Preliminary HPLC study on some polyphenols of *Geranium robertianum* L. (Geraniaceae). **Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi**, 109, 174–178.

Fritzen, M.; Dutra, R. L.; Crivelli, S. R. M. (2016). **Farmacognosia I**. 1. ed. Rio de Janeiro: SESES.

Galan, A. M.; Calinescu, I.; Trifan, A.; Winkworth-Smith, C.; Calvocarrascal, M.; Dodds, C.; Binner E. (2017). New insights into the role of selective and volumetric heating during microwave extraction: Investigation of the extraction of polyphenolic compounds from sea buckthorn leaves using microwave-assisted extraction and conventional solvent extraction. **Chemical Engineering and Processing**, v. 116, p. 29-39.

Garcia, D. M., Reis, R. C., Costa, L. M., & Ferreira, N. M. P. (2022). Uso de revestimento comestível a base de resíduo de frutas adicionado de polpa de acerola para a conservação de frutas minimamente processadas. **Brazilian Journal of Development**, 8(1), 6301-6312.

Gelaleti, D., Galvão, I. S., Batista, M. M. L., Santos, V., Felix, M., Jardim, M., ... & de Souza Antunes, V. M. (2019). Estabilidade de formulação dermocosmética contendo extrato de *Pelargonium graveolens*. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, 2, 16.

Graça, V. C., Ferreira, I. C., & Santos, P. F. (2016). Phytochemical composition and biological activities of *Geranium robertianum* L.: A review. **Industrial Crops and Products**, 87, 363-378.

Graça, V. C., Barros, L., Calhelha, R. C., Dias, M. I., Ferreira, I. C., & Santos, P. F. (2017). Bio-guided fractionation of extracts of *Geranium robertianum* L.: Relationship between phenolic profile and biological activity. **Industrial Crops and Products**, 108, 543-552.

Hager, J. V., Rawles, S. D., Xiong, Y. L., Newman, M. C., Thompson, K. R., & Webster, C. D. (2019). *Listeria monocytogenes* is inhibited on fillets of cold-smoked sunshine bass, *Morone chrysops* × *Morone saxatilis*, with an edible corn zein-based coating incorporated with lemongrass essential oil or nisin. **Journal of the World Aquaculture Society**, 50(3), 575-592.

Han, J. H. (2014). Edible films and coatings: a review. **Innovations in food packaging**, 213-255.

Hashemi-Moghaddam, H., Kalatejari, A., Afshari, H., & Ebadi, A. H. (2013). Microwave accelerated distillation of essential oils from the leaves of *Eucalyptus microtheca*: Optimization and comparison with conventional hydrodistillation. **Asian J Chem**, 25, 5423-5427.

Held D. W., Gonsiska P., Potter D. A. (2003) Evaluating companion planting and non-host masking odors for protecting roses from the Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae). **J Econ Entomol** 96, p. 81–87

Ibrahim, R. R., Ibrahim, H. A., Shabana, S. S., El-Hosari, D. G., Ali, S. A., Mahgoub, S., & Moharram, F. A. (2021). New phenolic compounds from *Calothamnus quadrifidus* R. Br. aerial parts and their antioxidant activity. **Natural Product Research**, 35(23), 5183-5191.

Ilić, M., Samardžić, S., Kotur-Stevuljević, J., Ušjak, D., Milenković, M., Kovačević, N., & Drobac, M. (2021). Polyphenol rich extracts of *Geranium* L. species as potential natural antioxidant and antimicrobial agents. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, 25(20), 6283-6294.

Ivancheva, S., Petrova, A. (2000). A chemosystematic study of eleven *Geranium* species. **Biochem. Syst. Ecol.**, 28, 255–260.

Kempes, N. F., Alves, W. O., Camargo, C. F., Sanches, M. S., Vidoto, A., Silva, D. O. M., & Jacob, E. A. L. (2014). Extração simplificada dos princípios ativos do capim limão, *Cymbopogon citratus*. **Anais do II Encontro PIBID/CAPES/FAI**, Adamantina, p. 12.

Khadhraoui, B., Ummat, V., Tiwari, B. K., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2021). Review of ultrasound combinations with hybrid and innovative techniques for extraction and processing of food and natural products. **Ultrasonics Sonochemistry**, 76, 105625.

Khalil, H. P. S., Tye, Y. Y., Saurabh, C. K., Leh, C. P., Lai, T. K., Chong, E. W. N., ... & Syakir, M. I. (2017). Biodegradable polymer films from seaweed polysaccharides: A review on cellulose as a reinforcement material. **Express Polymer Letters**, 11(4).

Khajuria, V., Gupta, S., Sharma, N., Tiwari, H., Bhardwaj, S., Dutt, P., ... & Ahmed, Z. (2018). Kaempferol-3-o- β -d-glucuronate exhibit potential anti-inflammatory effect in LPS stimulated RAW 264.7 cells and mice model. **International Immunopharmacology**, 57, 62-71.

Kobakhidze, K.B., Alaniya, M.D. (2004). Flavonoids from *Geranium robertianum*. **Chem. Nat. Compd.**, 40, 89–90.

Konarska, A., Masierowska, M. (2020). Structure of floral nectaries and female-biased nectar production in protandrous species *Geranium macrorrhizum* and *Geranium phaeum*. **Protoplasma**, 257(2), 501-523.

Kumar, M., Sharma, B. D. (2004). The storage stability and textural, physico-chemical and sensory quality of low-fat ground pork patties with carrageenan as fat replacer. **International Journal of Food Science and Technology**. 39:1 p. 31.

Kumar, M.; Dahuja, A.; Sachdev, A.; Kaur, C.; Varghes, E.; Saha, S.; Sairam., K. V. S. S. (2019). Evaluation Of Enzyme And Microwave-Assisted Conditions On Extraction Of Anthocyanins And Total Phenolics From Black soybean (*Glycine Max L.*) Seed Coat. **International. J. Biol. Macromol.**, 135, 1070– 1081.

Kumar, P., Kumar, L., Tanwar, R., Singh, S., & Gaikwad, K. K. (2023). Active edible coating based on guar gum with mint extract and antibrowning agents for ber (*Ziziphus mauritiana*) fruits preservation. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 17(1), 129-142.

Kuwar, U.; Sharma, S.; Tadapaneni, V.R.R. (2015). Aloe vera gel and honey-based edible coatings combined with chemical dip as a safe means for quality maintenance and shelf life extension of fresh-cut papaya. **J. Food Qual.**, 38, 347–358.

Laface, F., Peda, C., Giommi, C., Scozzafava, S., Rizzo, C., Malara, D., & Romeo, T. (2023). A glimpse into the future: a suitable methodological approach for the detection and identification of micro-bioplastics in biota. **Sci. Total Environ.**, 899, 165613.

Lara, G., Yakoubi, S., Villacorta, C. M., Uemura, K., Kobayashi, I., Takahashi, C., ... & Neves, M. A. (2020). Spray technology applications of xanthan gum-based edible coatings for fresh-cut lotus root (*Nelumbo nucifera*). **Food Research International**, 137, 109723.

Lazaridou, A.; Biliaderis, C. G. (2020). Edible films and coatings with pectin. **Pectin: Technological and physiological properties**, p. 99-123.

Li, J.; Zu, Y.; Fu, Y.; Yang, Y.; Li, S.; Li, Z.; Wink, M. (2010). Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 637-643.

Li, L., Ni, R., Shao, Y., & Mao, S. (2014). Carrageenan and its applications in drug delivery. **Carbohydrate polymers**, 103, 1-11.

Sánchez-García, M. D., Hilliou, L., & Lagarón, J. M. (2010). Morphology and water barrier properties of nanobiocomposites of κ /i-hybrid carrageenan and cellulose nanowhiskers. **Journal of agricultural and food chemistry**, 58(24), 12847-12857.

Sharma, D., Tekade, R. K., & Kalia, K. (2020). Kaempferol in ameliorating diabetes-induced fibrosis and renal damage: an in vitro and in vivo study in diabetic nephropathy mice model. **Phytomedicine**, 76, 153235.

Malgarim, M. B., Cantillano, R. F. F., & Coutinho, E. F. (2006). Sistemas e condições de colheita e armazenamento na qualidade de morangos cv. Camarosa. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 28, 185-189.

Marcussen, T., & Meseguer, A. S. (2017). Species-level phylogeny, fruit evolution and diversification history of *Geranium* (Geraniaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 110, 134-149.

Masierowska M, Stawiarz E, Rozwałka R (2018). Perennial ground cover plants as foral resources for urban pollinators: a case of Geranium species. **Urban Forest Urban Green** 32:185–194.

Melecchi, M. I. S. (2005). Caracterização química de extratos de Hibiscus tiliaceus: estudo comparativo de métodos de extração.

Melek, F. R., El Zalabani, S. M., Ghaly, N. S., Sabry, O. M., Fayad, W., & Boulis, A. G. (2021). Phytoconstituents with cytotoxic activity from Ulmus pumila L. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 11(5), 127-134.

Menzel, C., Olsson, E., Plivelic, T. S., Andersson, R., Johansson, C., Kuktaite, R., et al. (2013). Molecular structure of citric acid cross-linked starch films. **Carbohydrate Polymers**, 96, 270-276.

Musa, K. H., Abdullah, A., Kuswandi, B., & Hidayat, M. A. (2013). A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. **Food chemistry**, 141(4), 4102-4106.

Neagu, E., Paun, G., Constantin, D., & Radu, G. L. (2017). Cytostatic activity of Geranium robertianum L. extracts processed by membrane procedures. **Arabian Journal of Chemistry**, 10.

Nikolova, M., Tsvetkova, R., & Ivancheva, S. (2010). Evaluation of antioxidant activity in some Geraniacean species. **Botanica serbica**, 34(2), 123-125.

Nouri, A., Yaraki, M. T., Ghorbanpour, M., & Wang, S. (2018). Biodegradable κ-carrageenan/nanoclay nanocomposite films containing Rosmarinus officinalis L. extract for improved strength and antibacterial performance. **International journal of biological macromolecules**, 115, 227-235.

Oms-Oliu, G., Rojas-Graü, M. A., González, L. A., Varela, P., Soliva-Fortuny, R., Hernando, M. I. H., ... & Martín-Belloso, O. (2010). Recent approaches using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit: A review. *Postharvest biology and technology*, 57(3), 139-148.

Paun, G., Neagu, E., Litescu, S. C., Rotinberg, P., & Radu, G. L. (2012). Application of membrane processes for the concentration of Symphytum officinale and Geranium robertianum extracts to obtain compounds with high anti-oxidative activity. **Journal of the Serbian Chemical Society**, 77(9).

Paun, G., Litescu, S.C., Neagu, E., Tache, A., Radu, G.L. (2014). Evaluation of Geranium spp., Helleborus spp. and Hyssopus spp. polyphenolic extracts inhibitory activity against urease and -chymotrypsin. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.**, 29, 28–34.

Radulović, N., Dekić, M., & Stojanović-Radić, Z. (2012). Chemical composition and antimicrobial activity of the volatile oils of Geranium sanguineum L. and G. robertianum L.(Geraniaceae). **Medicinal Chemistry Research**, 21, 601-615.

Rehman, S., Nabi, B., Ahmad, S., Baboota, S., & Ali, J. (2019). Polysaccharide-based amorphous solid dispersions (ASDs) for improving solubility and bioavailability of drugs. **Polysaccharide Carriers for Drug Delivery**, p. 271-317.

Roriz, C. L., Barros, L., Prieto, M. A., Morales, P., & Ferreira, I. C. (2017). Floral parts of *Gomphrena globosa* L. as a novel alternative source of betacyanins: Optimization of the extraction using response surface methodology. **Food chemistry**, 229, 223-234.

Roselló-Soto, E., Koubaa, M., Moubarik, A., Lopes, R. P., Saraiva, J. A., Boussetta, N., ... & Barba, F. J. (2015). Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: non-conventional methods for the recovery of high-added value compounds. **Trends in Food Science & Technology**, 45(2), 296-310.

Roxo, M., Peixoto, H., Wetterauer, P., Lima, E., & Wink, M. (2020). Piquiá Shells (*Caryocar villosum*): A fruit by-product with antioxidant and antiaging properties in *Caenorhabditis elegans*. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2020, 1-19.

Rubió, L., Motilva, M. J., & Romero, M. P. (2013). Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles. **Critical reviews in food science and nutrition**, 53(9), 943-953.

Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2015). Use of antimicrobial nanoemulsions as edible coatings: Impact on safety and quality attributes of fresh-cut Fuji apples. **Postharvest Biology and Technology**, 105, 8–16.

Santos, S.F., Catarino, M.D., Marcos, M., Ferreira, F.M., Sobral, A.J.F.N., Cardoso, S.M. (2013). Antioxidant properties of *Geranium robertianum* L. **Conference. Eur. J. Clin. Invest.**, 43(1), 3–96.

Sedaki, A. (2022). Antimicrobial and bioactive property monitorization of a polymer-based food contact material (Master's thesis, Instituto Politecnico de Braganca (Portugal)).

Sedayu, B. B., Cran, M. J., & Bigger, S. W. (2019). A review of property enhancement techniques for carrageenan-based films and coatings. **Carbohydrate Polymers**, 216, 287-302.

Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., de Mello, J. C. P., Mentz, L. A., & Petrovick, P. R. (2016). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**.

Simona, J., Dani, D., Petr, S., Marcela, N., Jakub, T., & Bohuslava, T. (2021). Edible films from carrageenan/orange essential oil/trehalose—structure, optical properties, and antimicrobial activity. **Polymers**, 13(3), 332.

Stanković, M. M., Ristivojević, P. M., Ivković, Đ. D., Milutinović, M. G., Terzić, J. N., & Stefanović, O. D. (2024). A comprehensive study on *Geranium robertianum* L. antibacterial potential. **Journal of Applied Microbiology**, 135(5), 1xae106.

Suhag, R., Kumar, N., Petkoska, A. T., & Upadhyay, A. (2020). Film formation and deposition methods of edible coating on food products: A review. **Food Research International**, 136, 109582.

Świątek, Ł., Wasilewska, I., Boguszewska, A., Grzegorzczak, A., Rezmer, J., Rajtar, B., ... & Sieniawska, E. (2023). Herb Robert's Gift against Human Diseases: Anticancer and Antimicrobial Activity of *Geranium robertianum* L. **Pharmaceutics**, 15(5), 1561.

Tabari M. A., Hajizadeh Moghaddam A., Maggi F., Benelli G. (2018). Anxiolytic and antidepressant activities of *Pelargonium roseum* essential oil on Swiss albino mice: possible involvement of serotonergic transmission. **Phytother Res** 32(6):1014–1022

Tahir, H.E., Xiaobo, Z., Mahunu, G.K., Arslan, M., Abdalhai, M., Zhihua, L. (2019). Recent developments in gum edible coating applications for fruits and vegetables preservation: A review. **Carbohydr. Polym.**, 224, 115141.

Tian, Y., Xu, Z., Zheng, B., & Lo, Y. M. (2013). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil. **Ultrasonics sonochemistry**, 20(1), 202-208.

Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Valentine, D. H., Walters, S. M., & Webb, D. A. (Eds.). (1976). **Flora Europaea: Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae)** (Vol. 4). Cambridge university press.

Valdés, A., Burgos, N., Jiménez, A., & Garrigós, M. C. (2015). Natural pectin polysaccharides as edible coatings. **Coatings**, 5(4), 865-886.

Vaz, J. A., Heleno, S. A., Martins, A., Almeida, G. M., Vasconcelos, M. H., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Wild mushrooms *Clitocybe alexandri* and *Lepista inversa*: In vitro antioxidant activity and growth inhibition of human tumour cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, 48(10), 2881–2884.

Verma, R. K., Chauhan, A., Verma, R. S., Rahman, L. U., & Bisht, A. (2013). Improving production potential and resources use efficiency of peppermint (*Mentha piperita* L.) intercropped with geranium (*Pelargonium graveolens* L. Herit ex Ait) under different plant density. **Industrial Crops and Products**, 44, 577-582.

Weng, M. L., Blazier, J. C., Govindu, M., & Jansen, R. K. (2014). Reconstruction of the ancestral plastid genome in Geraniaceae reveals a correlation between genome rearrangements, repeats, and nucleotide substitution rates. **Molecular biology and evolution**, 31(3), 645-659.

Yacoub SS, El-Hefny AS, El-Hosary RA (2011) Intercropping of some ornamental plants in corn field to reduce *Sesamia cretica* Led. infestation. **Egypt J Agric Res** 89:113–119

Yousuf, B., Wu, S., Siddiqui, M.W. (2021). Incorporating essential oils or compounds derived thereof into edible coatings: Effect on quality and shelf life of fresh/fresh-cut produce. **Trends in Food Science & Technology** 108, 245–257

Yuguchi, Y., Thuy, T. T. T., Urakawa, H., & Kajiwara, K. (2002). Structural characteristics of carrageenan gels: temperature and concentration dependence. **Food hydrocolloids**, 16(6), 515-522.