



CAROLINA SALLES FREIRE

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO E ANTIOCRATOXIGÊNICO
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* E *Callistemon
viminalis* ENCAPSULADOS EM NANOFIBRAS DE PLA
FRENTE AOS FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus***

**LAVRAS – MG
2023**

CAROLINA SALLES FREIRE

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO E ANTIOCRATOXIGÊNICO DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Rosmarinus officinalis* E *Callistemon viminalis* ENCAPSULADOS EM
NANOFIBRAS DE PLA FRENTE AOS FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/Bioquímica para obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

Prof. Dr. Luís Roberto Batista
Coorientador

Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira
Coorientador

**LAVRAS – MG
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Freire, Carolina Salles.

Potencial antifúngico e anti-ocratogênico do óleo essencial de
Rosmarinus officinalis e *Callistemon viminalis* encapsulados em nanofibras
de PLA frente aos fungos do gênero *Aspergillus*. / Carolina Salles Freire.
- 2023.

87 p.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Coorientador(a): Luís Roberto Batista, Juliano Elvis de Oliveira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras,
2023.

Bibliografia.

1. Produtos Naturais. 2. Nanotecnologia. 3. Ocratoxina A. I. Cardoso,
Maria das Graças. II. Batista, Luís Roberto. III. de Oliveira, Juliano Elvis

CAROLINA SALLES FREIRE

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO E ANTIOCRATOXIGÊNICO DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Rosmarinus officinalis* E *Callistemon viminalis* ENCAPSULADOS EM
NANOFIBRAS DE PLA FRENTE AOS FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus***

**ANTIFUNGAL AND ANTIOCRATOXIGENIC POTENTIAL OF *Rosmarinus
officinalis* AND *Callistemon viminalis* ESSENTIAL OILS ENCAPSULATED IN PLA
NANOFIBERS AGAINST *Aspergillus* FUNGI**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/Bioquímica para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de junho de 2023.

Dr. Sérgio Scherrer Thomasi UFLA

Dr. Juliano Elvis de Oliveira UFLA

Dra. Juliana de Andrade Santiago SEE/MG

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

Prof. Dr. Luís Roberto Batista
Coorientador

Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira
Coorientador

**LAVRAS – MG
2023**

Aos meus pais, José Mário e Lúcia, à minha irmã, Isabela, minha sobrinha, Júlia e meu namorado André por todo o carinho, incentivo e apoio.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus pela vida, pelas oportunidades e pela força para ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da Pós-graduação. Agradeço imensamente pelas pessoas que o Senhor colocou em meu caminho.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Química e ao Programa de Agroquímica, pela oportunidade, pelo suporte e por toda a estrutura que me permitiu desenvolver esta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa concedida, tornando possível a realização deste trabalho.

À professora Dra. Maria das Graças Cardoso, por ter aberto as portas do laboratório, pelos ensinamentos, oportunidades, amizade e confiança. Obrigada por dedicar seu tempo orientando-me para que eu pudesse crescer profissionalmente e socialmente.

Ao professor Dr. Luís Roberto Batista, pela disponibilidade e incentivo, para que este projeto fosse realizado e por abrir as portas do laboratório de microbiologia.

Ao professor Dr. Juliano Elvis de Oliveira, pela paciência, incentivo, ideias e apoio neste trabalho.

Aos meus pais, José Mário e Lúcia, minhas maiores inspirações, por sempre acreditarem na minha capacidade, por me incentivarem nos momentos difíceis e pelo amor incondicional, sem medir esforços para que eu chegasse até aqui.

À minha irmã, Isabela e minha sobrinha, Júlia, por estarem sempre ao meu lado incentivando-me e proporcionando-me todo amor e carinho.

Ao meu namorado, André, por toda a paciência, consolo, palavras de carinho e amor, que me fizeram manter firme e nunca pensar em desistir.

Aos demais familiares e amigos pela amizade e apoio.

Aos amigos do Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais e de Análise de Qualidade de Aguardente, Gabriela, Alex, Gislaine, Vanúzia, Cassia, Antônia Isadora, Luciano, Maria Augusta, Giovana, Anna Beatriz, Lucas e Sofia, pela boa convivência, amizade e apoio. E, em especial, a Dra. Maria Luisa Teixeira, por sempre ajudar em todas as pesquisas.

À Central de Análises de Prospecção Química da Universidade Federal de Lavras (CAPQ-UFLA).

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análises Ultraestruturais (LME-UFLA), pelo fornecimento dos equipamentos para análises.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química da UFLA, por todos ensinamentos e amizade.

Aos membros da banca, por contribuírem com este trabalho.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A contaminação dos alimentos por microrganismos tem causado perdas significativas às indústrias, deteriorando-os, bem como produzindo micotoxinas. Os óleos essenciais, uma mistura de vários compostos voláteis extraídos das plantas, desempenham um papel importante no controle da contaminação fúngica, devido às suas propriedades biológicas. O óleo essencial vem sendo incorporado em nanofibras, visando maior estabilidade, evitando a sua volatilização e degradação, bem como proporcionando uma liberação controlada dos seus constituintes. Objetivou-se com este trabalho extrair e caracterizar quimicamente os componentes do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* e *Callistemon viminalis*; produzir por meio da fiação por sopro em solução (SBS) nanofibras de poli (ácido lático) (PLA) incorporados com os óleos essenciais; caracterizar físico-quimicamente as nanofibras e avaliar a atividade antifúngica, antiocratogênica *in vitro* das nanofibras, dos óleos essenciais, e do monoterpeneo 1,8-cineol sobre *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus westerdijkiae*. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação, caracterizados e quantificados por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC/MS) e Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chamas (GC/FID). As nanofibras produzidas foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia no Infravermelho (FTIR) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). As atividades antifúngica e antiocratogênica foram avaliadas pelo método de fumigação, a ocratoxina A foi quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e a análise morfológica dos microrganismos por meio do MEV. Os compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *R. officinalis* foram 1,8-cineol e cânfora e para o óleo essencial de *C. viminalis* foram 1,8-cineol e α -pineno. As eletromicrografias mostraram aumento no diâmetro médio das nanofibras com óleo essencial, devido ao aumento na viscosidade da solução polimérica. O potencial antifúngico foi significativo para todas as concentrações de óleo essencial e nanofibras testadas; apenas para o fungo *A. niger* não ocorreu inibição do crescimento micelial. A produção de ocratoxina A dos fungos *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* foi inibida pelos tratamentos com óleo essencial (3000 $\mu\text{L L}^{-1}$), nanofibras incorporadas com 20% (p/v) de óleo essencial e pelo monoterpeneo 1,8-cineol (3000 $\mu\text{L L}^{-1}$). Diante dos resultados infere-se que os óleos essenciais e as nanofibras de PLA podem ser promissores e viáveis de aplicação na indústria alimentícia para controle de fungos toxigênicos e da ocratoxina A.

Palavras-chave: Alecrim. Escova-de-garrafa. Nanofibras. Produtos naturais. Micotoxinas.

ABSTRACT

Food contamination by microorganisms has caused significant losses for industries because of the deterioration of food, as well as the production of mycotoxins. Essential oils, a complex mixture of various constituents, play an important role in controlling fungal contamination because of their biological properties. The essential oil has been incorporated into nanofibers, seeking to increase its stability, avoiding volatilization and degradation, obtain a controlled release of its compounds. The objectives of this work were to extract and chemically characterize the components of the essential oils from *Rosmarinus officinalis* and *Callistemon viminalis*; to produce nanofibers of poly(lactic acid) (PLA) containing the essential oils by means of solution blow spinning (SBS); to physicochemically characterize the nanofibers and evaluate the in vitro antifungal and antimycotoxigenic activity of the nanofibers, the essential oils, and the monoterpene 1,8-cineol against *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae*. The essential oils were extracted by hydrodistillation, characterized and quantified by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC/MS) and gas chromatography with a flame ionization detector (GC/FID). The nanofibers produced were characterized by scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC). The antifungal and antimycotoxigenic activities were evaluated by the fumigation method, and the morphological analysis of the microorganisms by SEM. The principal compounds found in the essential oil from *R. officinalis* were 1,8-cineole and camphor and those in the essential oil from *C. viminalis* were 1,8-cineole and α -pinene. Electromicrographs showed an increase in the diameter of nanofibers containing an essential oil. The antifungal potential was significant for all concentrations of the essential oil and nanofibers tested, and there was no inhibition of mycelial growth only for the fungus *A. niger*. The production of ochratoxin A by the fungi *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae* was inhibited by treatments with the essential oil, nanofibers incorporated with the oil and by the monoterpene 1,8-cineole. The results suggest that essential oils and PLA nanofibers can be promising and viable for application in the food industry to control toxigenic fungi and ochratoxin A.

Keywords: Rosemary. Bottlebrush. Nanofibers. Natural products. Mycotoxins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rota biossintética dos metabólitos secundários das plantas.....	17
Figura 2. Mecanismo da biossíntese de isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) pela via do mevalonato. (Continua).....	20
Figura 3. Mecanismo da biossíntese de isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) pela via do mevalonato. (Conclusão).....	21
Figura 4. Mecanismo da biossíntese de isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) pela via do DXPS. (Continua).....	22
Figura 5. Mecanismo da biossíntese de isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) pela via do DXPS. (Conclusão).....	23
Figura 6. Condensação de unidades de IPP e DMAPP para formação dos precursores terpênicos GPP e FPP.....	24
Figura 7. Biossíntese de Fenilpropanoides. (Continua).....	25
Figura 8. Biossíntese de Fenilpropanoides. (Conclusão).....	26
Figura 9. Aspecto geral da espécie <i>Rosmarinus officinalis</i>	26
Figura 10. Aspecto geral da espécie <i>Callistemon viminalis</i>	28
Figura 11. Estrutura química da Ocratoxina A.....	32
Figura 12. Aspecto geral da nanofibra.....	34
Figura 13. Representação esquemática da fiação por sopro em solução (SBS).....	35
Figura 14. Estrutura química do PLA.....	36
ARTIGO 1	
Figura 1. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>A. ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> e <i>A. westerdijkiae</i> sobre efeito dos óleos essenciais de <i>R. officinalis</i> e <i>C. viminalis</i> e do monoterpeno 1,8-cineol.....	51
Figura 2. Micrografias eletrônicas de varredura de <i>A. ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> e <i>A. westerdijkiae</i> tratados com óleo essencial de <i>R. officinalis</i> e <i>C. viminalis</i> e o monoterpeno 1,8-cineol.....	55
ARTIGO 2	
Figura 1. Cromatogramas de caracterização química do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> e <i>C. viminalis</i>	74
Figura 2. Eletromicrografias e valores de diâmetro médio das nanofibras.....	75
Figura 3. FTIR do óleo essencial, nanofibra de PLA pura e incorporada com óleo essencial.....	76
Figura 4. Eletromicrografias de varredura de <i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> e <i>A. westerdijkiae</i> sem tratamento e tratados com nanofibras de PLA incorporados com óleo essencial de <i>R. officinalis</i> e <i>C. viminalis</i>	81

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Tabela 1.** Teor de umidade e rendimento do óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis*.....64
- Tabela 2.** Composição química do óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis*.....64
- Tabela 3.** Inibição na síntese de ocratoxina A dos fungos *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae* tratados com óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis* e 1,8-cineol.....65

ARTIGO 2

- Tabela 1.** Propriedades térmicas das nanofibras de PLA puro (0%) e PLA com óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis*.....77
- Tabela 2.** Efeito das nanofibras incorporadas com óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis* no crescimento micelial de fungos do gênero *Aspergillus*.....78
- Tabela 3.** Inibição na síntese de ocratoxina A por *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* tratados com nanofibras de PLA incorporadas com óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis*.....79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Micotoxinas classificadas de acordo com a IARC.....	31
---	----

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1. Metabólitos Secundários das Plantas.....	16
2.2. Óleos Essenciais	17
2.3. Biossíntese de Terpenos.....	18
2.4. Biossíntese de Fenilpropanoides	24
2.5. <i>Rosmarinus officinalis</i> (Alecrim)	26
2.6. <i>Callistemon viminalis</i> (Escova-de-garrafa)	27
2.7. Atividade antifúngica de óleos essenciais	29
2.8. <i>Aspergillus</i>	30
2.9. Micotoxinas	31
2.10. Ocratoxina A	32
2.11. Nanofibras	33
2.12. Produção de nanofibras	34
2.13. Poli (ácido lático).....	36
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
REFERÊNCIAS.....	39
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....	45
ARTIGO 1 - Efeito antifúngico e antiocratogênico do óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> e <i>Callistemon viminalis</i> sobre fungos do gênero <i>Aspergillus</i>.....	46
ARTIGO 2- Atividade antifúngica e antimicotogênica de nanofibras de poli(ácido lático) incorporadas com óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> e <i>Callistemon viminalis</i> sobre fungos do gênero <i>Aspergillus</i>.....	67

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

Em escala mundial, o Brasil é o maior produtor e exportador de café das espécies *Coffea arabica* (Café arábica), seguido pela espécie *Coffea canephora* (Café conilon). O parque cafeeiro no Brasil abrange mais de 13 estados, sendo os maiores produtores os estados de Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo. A bebida obtida após o processo de torrefação e moagem dos grãos verdes apresenta grande valor econômico e benefícios para a saúde, sendo necessário garantir sua segurança e qualidade.

Após a colheita do café, teores de açúcares são encontrados na composição do fruto, sendo, portanto, um excelente meio para o desenvolvimento de microrganismos que podem comprometer a qualidade do alimento. Dentre esses microrganismos, podem-se destacar os fungos do gênero *Aspergillus*, que podem sintetizar as micotoxinas, substâncias tóxicas, que causam sérios danos à saúde humana e animal, como problemas agudos e crônicos, quando são ingeridos.

A busca por compostos químicos capazes de minimizar o desenvolvimento de microrganismos deterioradores de alimentos, bem como daqueles produtores de micotoxinas, coloca em destaque os produtos naturais. Eles têm sido alvos de pesquisa para substituir os produtos sintéticos, visando a encontrar substâncias com largo espectro de ação, que não impactam o meio ambiente e os seres vivos.

Nesse sentido, os óleos essenciais, uma mistura complexa de compostos orgânicos extraídos de plantas, vêm ganhando destaque por apresentarem diversas atividades biológicas de interesse, tais como antioxidante, antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, inseticida, antitumoral e várias outras. Além disso, os óleos essenciais apresentam menor toxicidade, se comparado às substâncias sintéticas, com relativa segurança alimentar, pois seus compostos químicos são, na sua maioria, classificados como agentes geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA).

Atrelado a esses fatores, a flora brasileira é bastante rica e diversificada, apresentando inúmeras espécies produtoras de óleos essenciais. As espécies de *Rosmarinus officinalis* e *Callistemon viminalis* são importantes fontes de metabólitos secundários, como os terpenos e fenilpropanoides, responsáveis pelas inúmeras atividades biológicas dessas plantas.

No entanto, os constituintes químicos presentes nos óleos essenciais apresentam certas limitações, como alta volatilidade, instabilidade na presença de luz e calor, dificultando, assim, sua aplicação direta. Dessa forma, o encapsulamento do óleo essencial em materiais poliméricos biodegradáveis, como poli (ácido lático), é uma alternativa para prolongar sua eficiência e

melhorar o seu uso. As nanofibras poliméricas são uma possibilidade de nanoencapsulamento dos óleos essenciais, proporcionando biodegradabilidade aceitável, liberação controlada dos constituintes químicos, uma maior área superficial e alta porosidade.

Objetivou-se neste estudo extrair e caracterizar quimicamente os óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* e *Callistemon viminalis*; produzir e caracterizar nanofibras de poli (ácido láctico) encapsulados com esses óleos essenciais pela técnica de fiação por sopro de solução (SBS); avaliar o potencial antifúngico e anticancerígeno das nanofibras, dos óleos essenciais e do monoterpeneo 1,8-cineol diante dos fungos *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus westerdijkiae* e analisar o efeito dos tratamentos na morfologia dos fungos por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

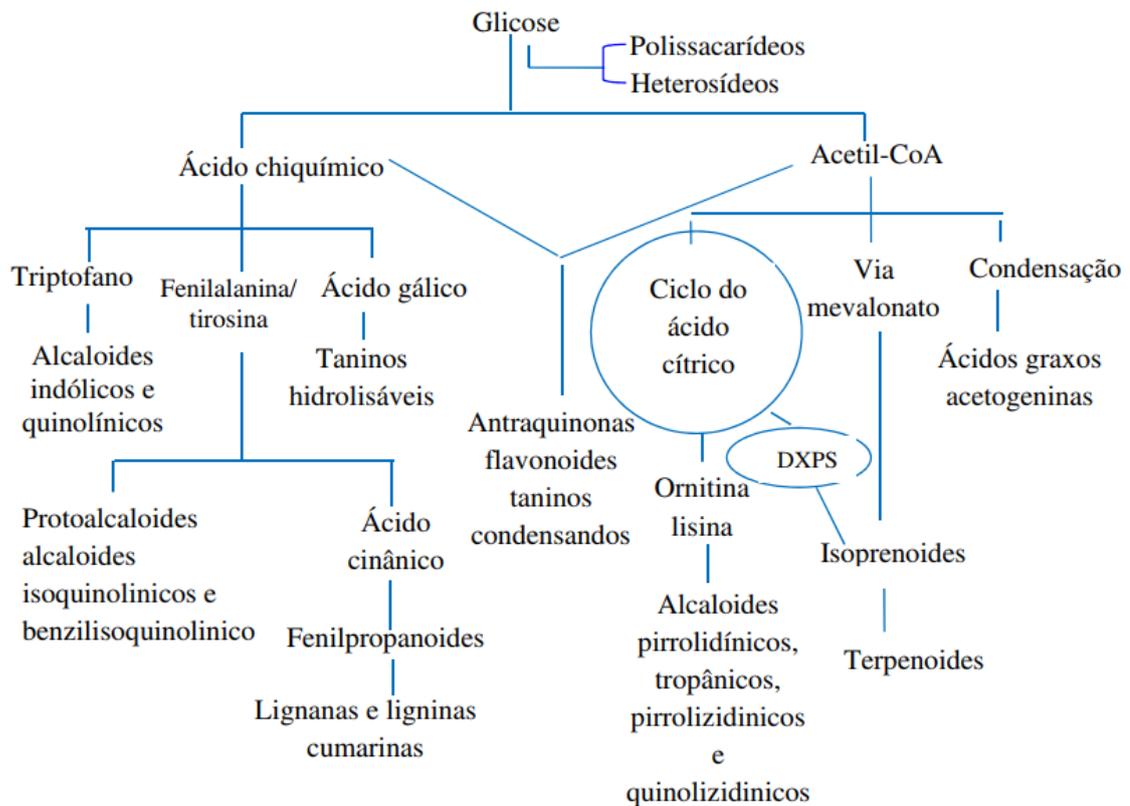
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Metabólitos Secundários das Plantas

As plantas produzem compostos biologicamente ativos que podem ser agrupados em duas categorias: os metabólitos primários e os secundários. Os metabólitos primários são representados por carboidratos, proteínas, lipídeos e outras moléculas que são essenciais nos organismos para a fisiologia da célula vegetal. A partir desses metabólitos são formados os metabólitos secundários, que são definidos pela síntese de substâncias que não são essenciais para a vida celular, mas vão proporcionar proteção contra herbívoros e microrganismos, além de garantir para a planta proteção contra a luz ultravioleta, atração de polinizadores e animais disseminadores de sementes (FUMAGALI *et al.*, 2008; MUTLU-INGOK *et al.*, 2020).

A biossíntese dos metabólitos secundários inicia-se segundo o catabolismo da glicose e se divide em duas vias: a via do ácido chiquímico e a via acetil-coenzima A (acetil-CoA), conforme mostrado na Figura 1. A via do ácido chiquímico é capaz de sintetizar os alcaloides aromáticos, taninos hidrolisáveis, cumarinas e os fenilpropanoides; e a via do acetil-CoA, que é responsável pela formação dos terpenos, dos ácidos graxos, dos alcaloides alifáticos e dos esteróis. Além disso, a síntese dos flavonoides, taninos condensados e antraquinonas tem como precursor ambos os intermediários (ácido chiquímico e unidades de acetato). (PEREIRA, CARDOSO, 2012).

Figura 1 – Rota biossintética dos metabólitos secundários das plantas



Fonte: Adaptado de Simões *et al.*, 2017

2.2. Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são definidos como metabólitos secundários de plantas, sendo formados a partir de uma mistura complexa de compostos orgânicos (terpenos e fenilpropanoides). De acordo com a International Organization for Standardization (ISO), os óleos essenciais podem ser obtidos por hidrodestilação, arraste a vapor d'água, e também pela prensagem do pericarpo de frutos cítricos. Eles apresentam alta volatilidade à temperatura ambiente, são lipofílicos, geralmente odoríferos, líquidos e raramente apresentam cor, como é o caso do óleo essencial de camomila. A composição química dos óleos essenciais é formada, basicamente, por átomos de carbono e hidrogênio, apresentando moléculas de baixo peso molecular. Ainda podem ter alguns grupos funcionais, como: álcoois, ésteres, éteres, fenóis, aldeídos, cetonas e outros (SIMÕES *et al.*, 2017).

Na natureza, os compostos químicos dos óleos essenciais apresentam uma importante ação de defesa química nas plantas devido às interações com predadores. Além disso, esses compostos estão envolvidos na atração de polinizadores, viabilizando a reprodução das espécies e na proteção contra a perda de água (MUTLU-INGOK *et al.*, 2020).

Os compostos presentes nos óleos essenciais são sintetizados em praticamente todos os órgãos da planta, tais como: folhas, caule, flores, frutos, sementes, raízes, botões florais e galhos. Podem estar localizados em diferentes estruturas secretoras, como: pelos glandulares, canais oleíferos e células parenquimáticas diferenciadas. Os óleos essenciais podem apresentar mais de 50 componentes distintos, sendo aqueles em maior concentração, geralmente, dois ou três constituintes, os quais são denominados de compostos majoritários. Essa mistura de compostos é instável, principalmente na presença de luz, calor, umidade, oxigênio, agentes oxidantes e redutores, podendo sofrer inúmeras reações de degradação (CARNEIRO *et al.*, 2019; SIMÕES *et al.*, 2017).

Alguns fatores podem influenciar no conteúdo dos óleos voláteis, como, por exemplo, o local de desenvolvimento da planta, o índice pluviométrico, a temperatura, a altitude, a sazonalidade, entre outros. Isso porque, dependendo da época do ano ou do horário em que a planta é coletada, a concentração dos compostos ativos de interesse pode ser alterada, bem como pode estar ausente (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os óleos essenciais são fonte promissora de moléculas potencialmente úteis ao homem. Apresentando, assim, atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, antitumoral, antisséptica, analgésica e inseticida comprovadas (BAKKALI *et al.*, 2008; REZENDE *et al.*, 2017). Esse potencial biológico dos óleos essenciais vem despertando o interesse das indústrias agroquímica, farmacêutica, cosmética e alimentícia. Os constituintes presentes em maior concentração nos óleos essenciais são geralmente os principais responsáveis por essas atividades, podendo, também, ter ação sinérgica ou antagônica dos compostos (BAKKALI *et al.*, 2008).

2.3. Biossíntese de Terpenos

Os terpenos são metabólitos secundários de grande abundância nos vegetais. Eles são classificados de acordo com o número de unidades de isoprenos (2-metil-1,3-butadieno); a condensação de duas unidades isoprênicas são denominadas monoterpenos ($C_{10}H_{16}$); três unidades isoprênicas são sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$), e os diterpenos ($C_{20}H_{32}$) são as moléculas que apresentam a condensação de quatro unidades isoprênicas (BAKKALI *et al.*, 2008). Na constituição química dos óleos essenciais, são comumente encontrados os monoterpenos e sesquiterpenos, pode haver, também, a presença de terpenoides, terpenos que apresentam elementos adicionais como o oxigênio. A diversidade de terpenoides deve-se às diferentes estruturas e grupos funcionais, como os álcoois, aldeídos, cetonas, éteres ou fenóis (LÜCKER, 2002).

A biossíntese dos terpenos deriva-se de duas vias distintas: a via do mevalonato e a via do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS). A via do mevalonato (Figura 2) ocorre no citosol e inicia-se pela junção de três moléculas de acetil-CoA por meio de uma série de reações químicas para formar o 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que é reduzido a ácido mevalônico em uma reação irreversível. Após a formação do ácido mevalônico, o álcool primário da sua estrutura química é fosforilado sequencialmente, formando um difosfato (ácido 3-fosfo-5-pirofosfatomevalônico). Em seguida, esse difosfato é descarboxilado e desidratado, formando assim o isopentenil difosfato (IPP) (Figura 3), o qual é convertido em dimetilalil difosfato (DMAPP) por ação de uma isomerase estereoespecífica. E a junção do IPP com o DMAPP forma os terpenos maiores (mono, sesqui e diterpenos), sendo o geranyl difosfato (GPP) um intermediário dessas unidades isoprênicas (Figura 3). Essa junção se inicia com a perda do grupo difosfato da molécula de DMAPP, dando origem a um carbocátion primário, o qual se adiciona a uma molécula de IPP por meio de uma reação enzimática de adição eletrofílica na dupla ligação (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015; TEIXEIRA, 2016).

Figura 2 – Mecanismo da biossíntese de isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) pela via do mevalonato. (Continua)

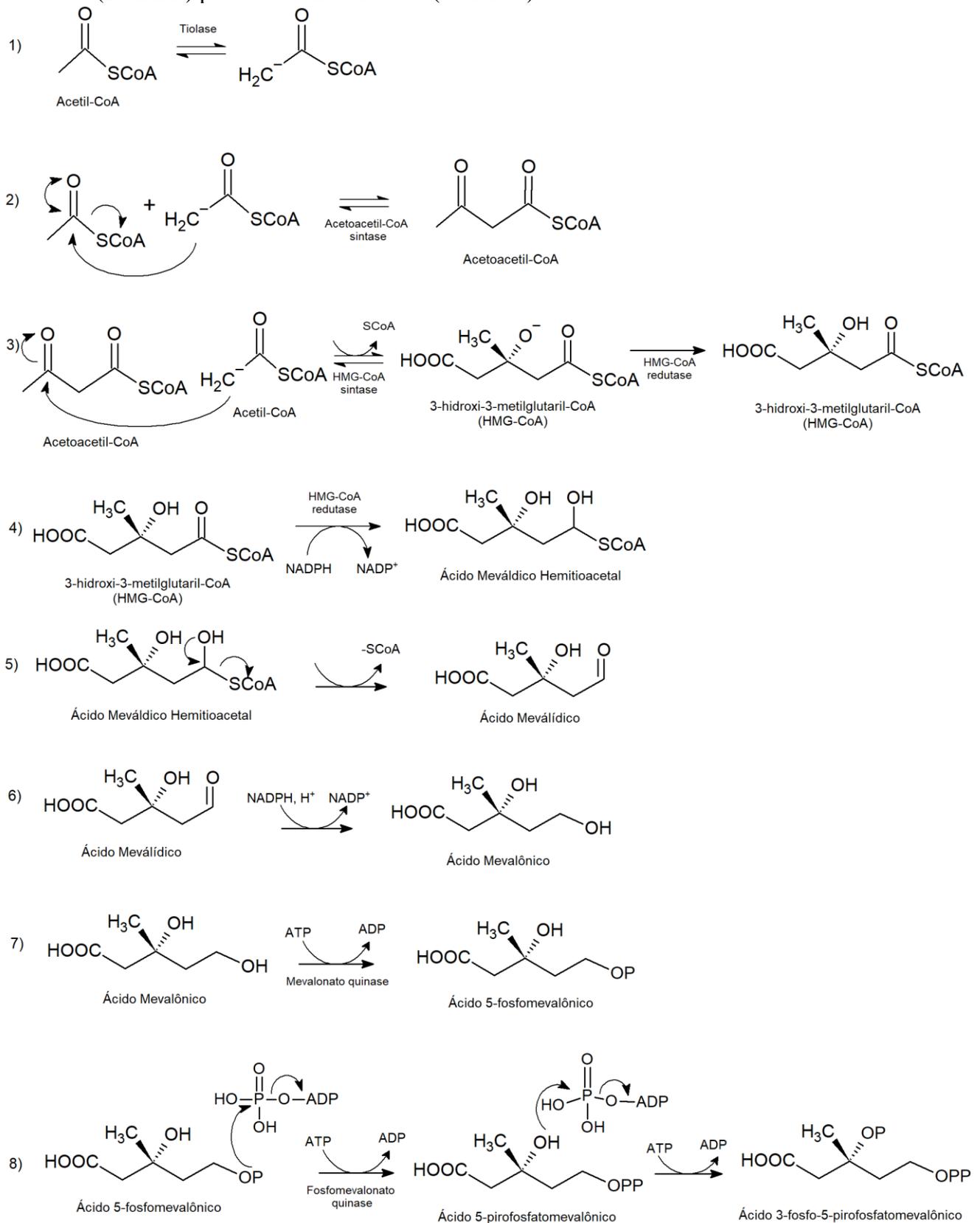
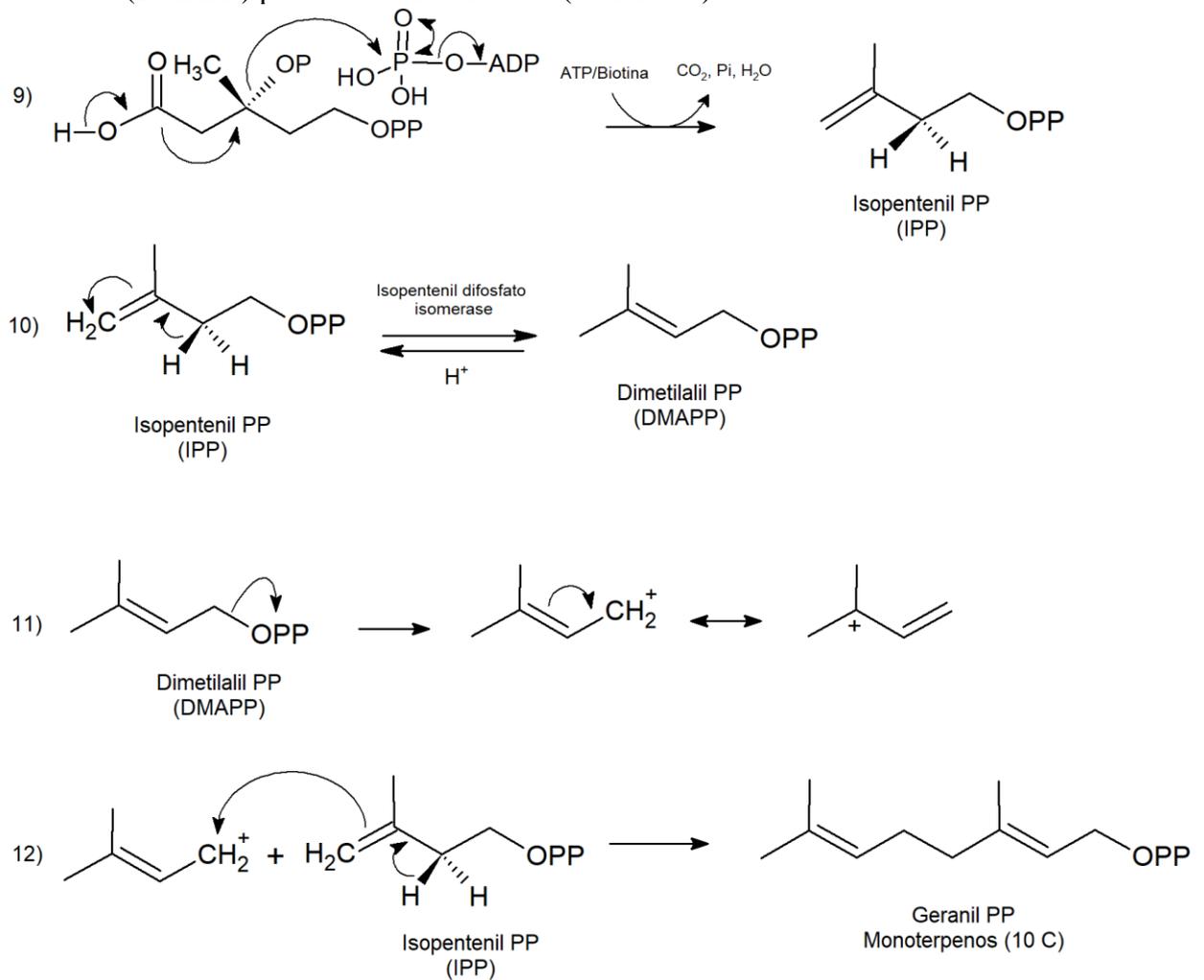


Figura 3 – Mecanismo da biossíntese de isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) pela via do mevalonato. (Conclusão)



Fonte: Adaptado de Teixeira (2016)

Os intermediários dos terpenos também podem ser formados pela via DXPS (Figura 4); essa biossíntese ocorre nos plastídios dos vegetais. A via inicia-se com a perda de um próton da tiamina difosfato, a qual atua como nucleófilo e se liga a uma molécula de ácido pirúvico, formando uma enamina. Em seguida, a enamina se liga ao gliceraldeído-3-fosfato para a formação do intermediário 1-Deoxi-D-xilulose-5-fosfato e regeneração do ânion de tiamina difosfato. Por meio de rearranjos e subsequente redução catalisada por NADPH, o DXPS é transformado em 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato. Em seguida, uma molécula de citidina trifosfato é adicionada ao produto da etapa anterior, formando o derivado de citidina 4-(CDP)-2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato, que é fosforilado por ação do ATP. A seguir, reações sucessivas levam à formação do IPP e do DMAPP (DEWICK, 2009).

Figura 4 – Mecanismo da biossíntese de isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) pela via do DXPS. (Continua)

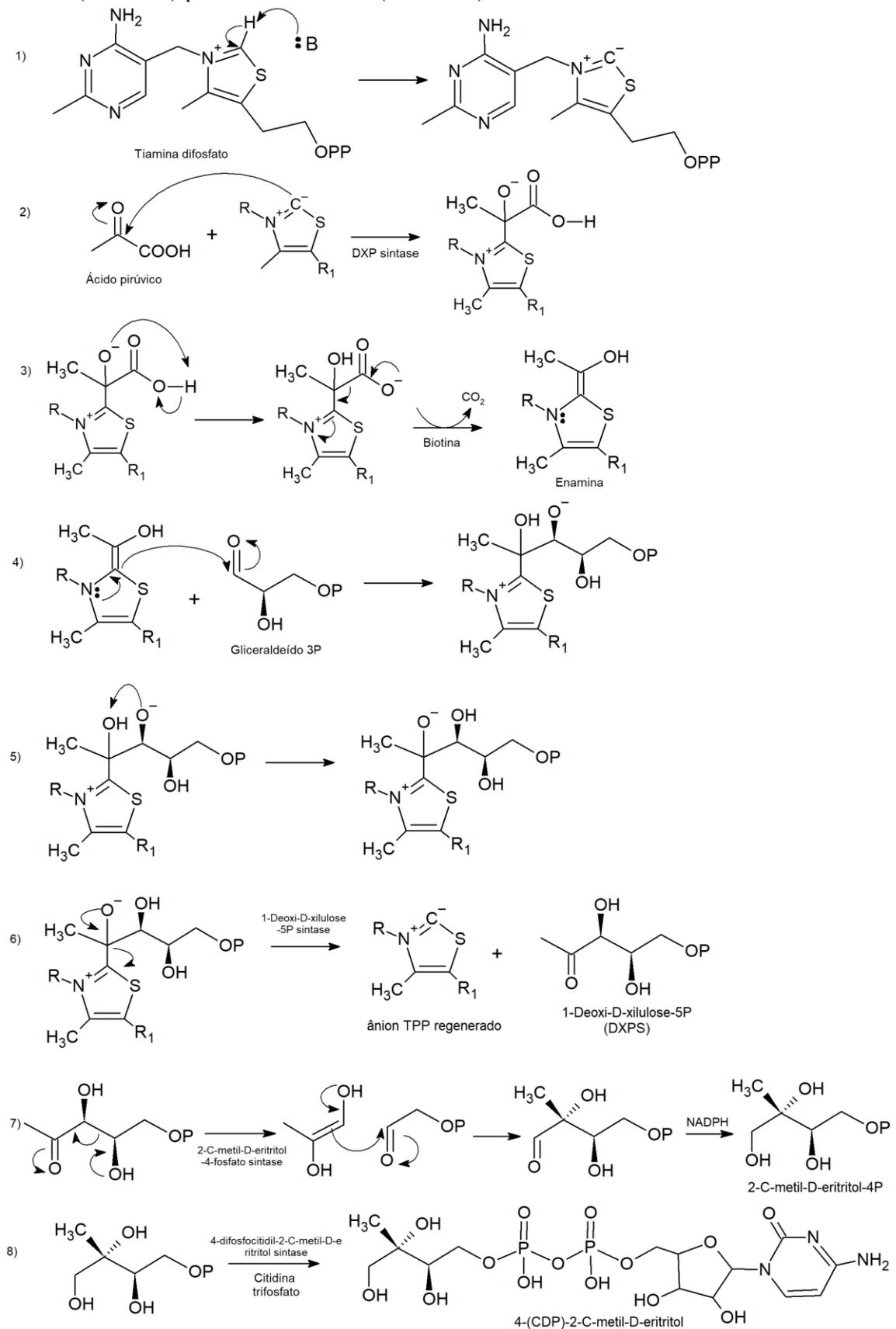
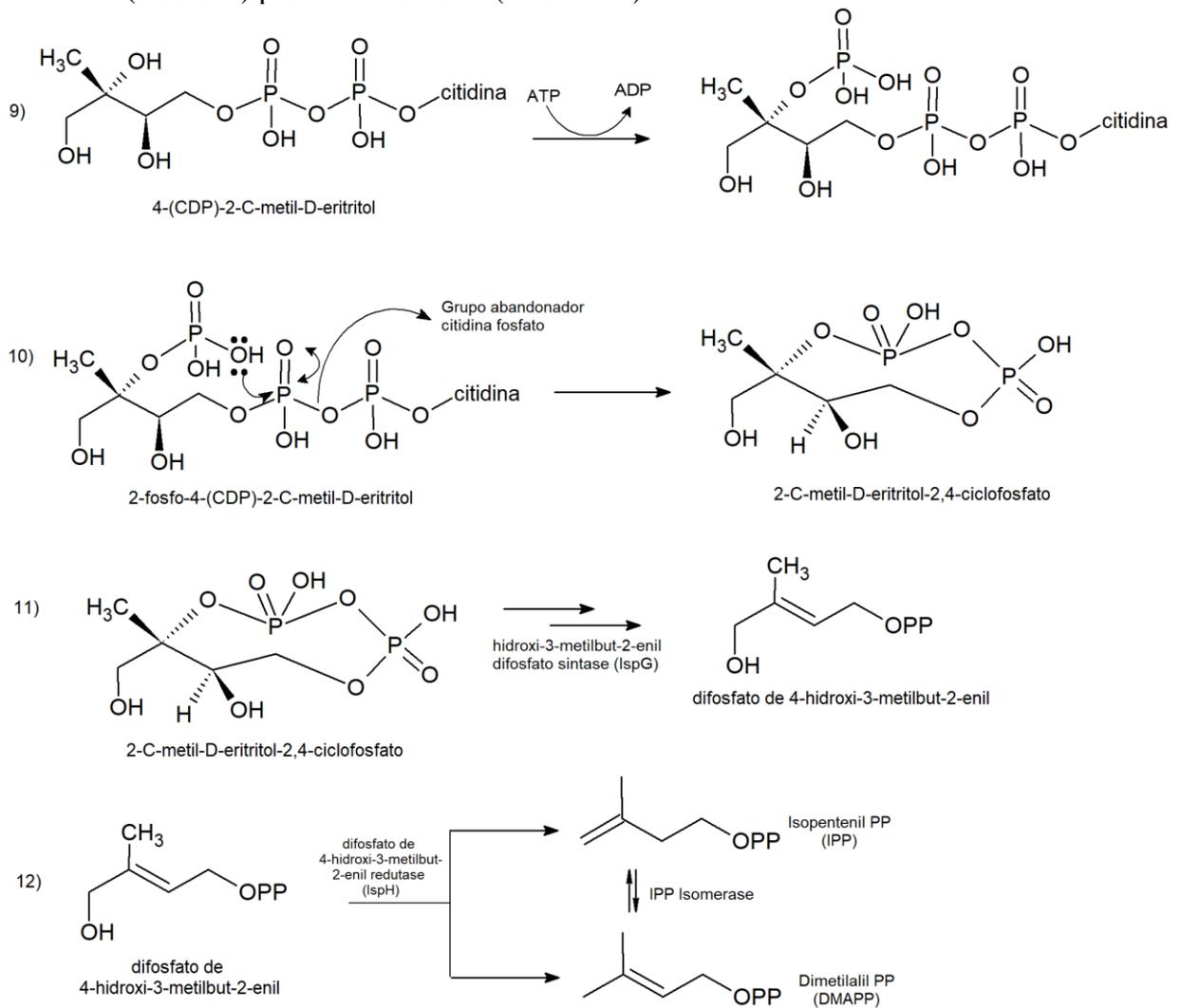


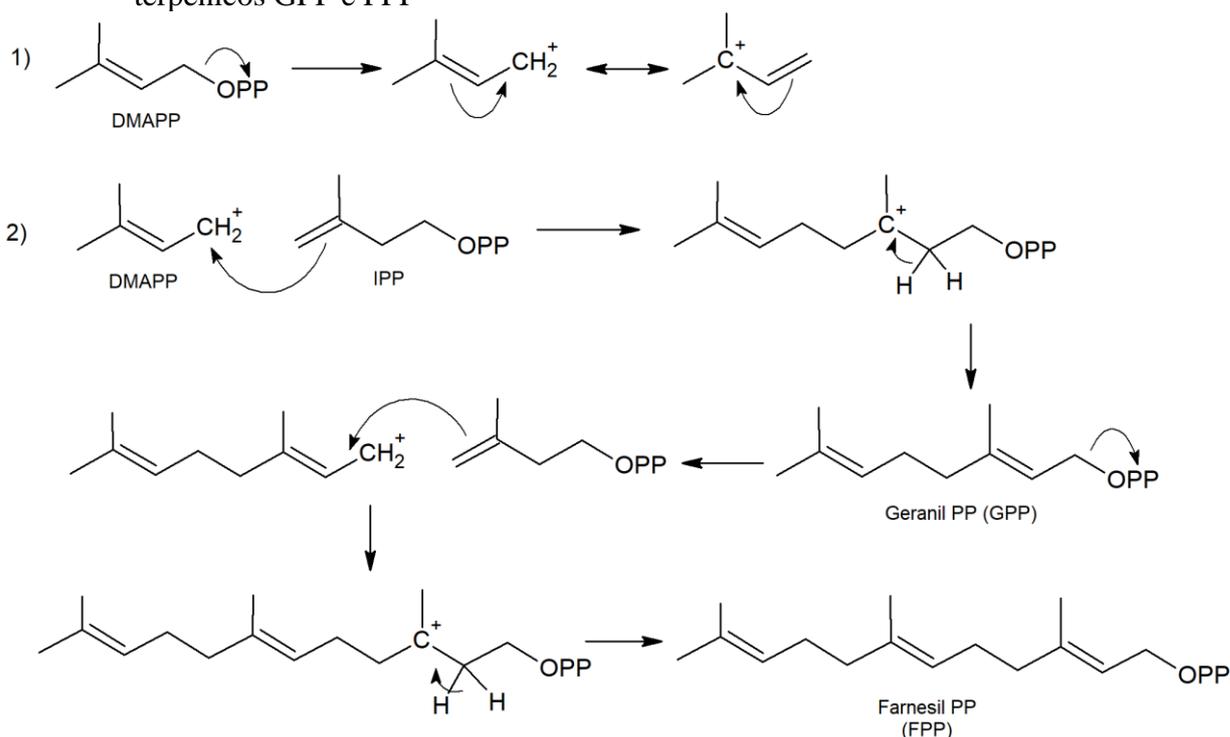
Figura 5 – Mecanismo da biossíntese de isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) pela via do DXPS. (Conclusão)



Fonte: Adaptado de Teixeira (2016)

A partir dos intermediários IPP e DMAPP, pode-se formar os monoterpenos com 10 átomos de carbono pela ação de enzimas específicas. Em seguida, é formado o intermediário geranyl difosfato (GPP), que se condensa com outra molécula de IPP para formar o farnesil difosfato (FPP), que é o precursor dos sesquiterpenos (Figura 6). Etapas seguintes podem formar estruturas maiores dos terpenos com 20 (diterpenos), 25 (sesterpenos), 30 (triterpenos) e 40 (tetraterpenos) átomos de carbono (DEWICK, 2009).

Figura 6 – Condensação de unidades de IPP e DMAPP para formação dos precursores terpênicos GPP e FPP



Fonte: Adaptado de Teixeira (2016)

2.4. Biossíntese de Fenilpropanoides

Os fenilpropanoides são uma classe de compostos químicos que, também, compõem os óleos essenciais. Eles são menos abundantes do que os terpenos e apresentam um anel aromático em sua estrutura e uma cadeia lateral composta por três átomos de carbono. Os fenilpropanoides são formados a partir do ácido chiquímico, que é um precursor obtido pela condensação aldólica de fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fosfato. Uma vez sintetizado, o ácido chiquímico reage com fosfoenolpiruvato para formar o ácido corísmico, que sofre um rearranjo intramolecular e, posteriormente, sintetiza os aminoácidos fenilalanina e tirosina (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

A fenilalanina é sintetizada mediante uma descarboxilação e desidratação do ácido prefênico, envolvendo o uso da enzima prefenato desidratase. Posteriormente, o ácido fenilpirúvico sofre uma aminação para ser convertido em fenilalanina. O aminoácido tirosina é formado a partir da enzima prefenato desidrogenase e NAD^+ , que catalisam a descarboxilação e desidratação do ácido prefênico. A tirosina é então obtida por uma aminação de forma semelhante à fenilalanina (SIMÕES *et al.*, 2017).

Os aminoácidos fenilalanina e tirosina sofrem reações de perda de uma molécula de amônia, dando, assim, origem aos ácidos cinâmicos e *p*-cumáricos, os quais passam por

inúmeras reações de redução, oxidação e ciclização para obtenção dos diferentes fenilpropanoides (SIMÕES *et al.*, 2017). Na Figura 7 está representado, de maneira simplificada, o mecanismo de formação de fenilpropanoides a partir da via do chiquimato.

Figura 7 – Biossíntese de Fenilpropanoides. (Continua)

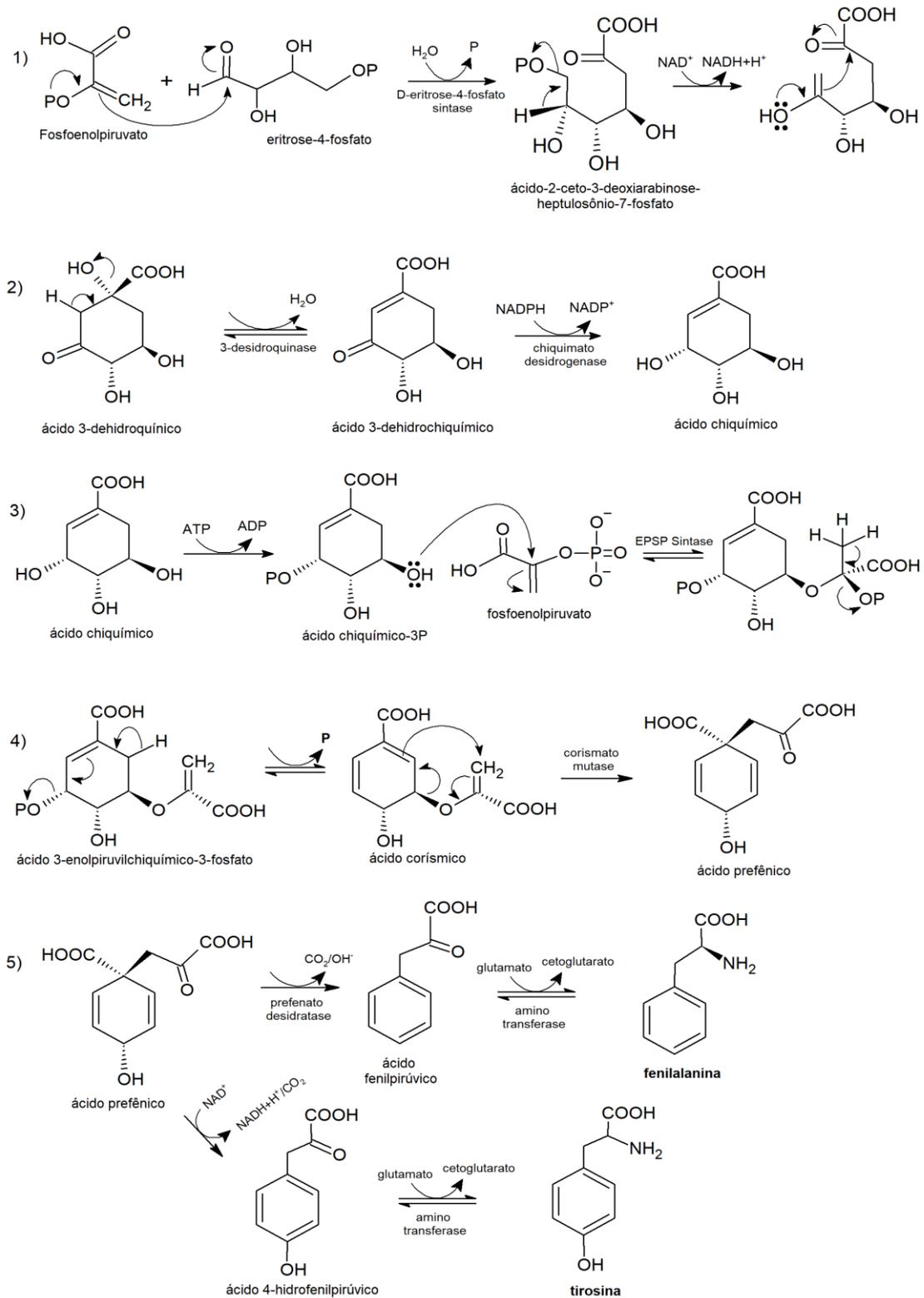
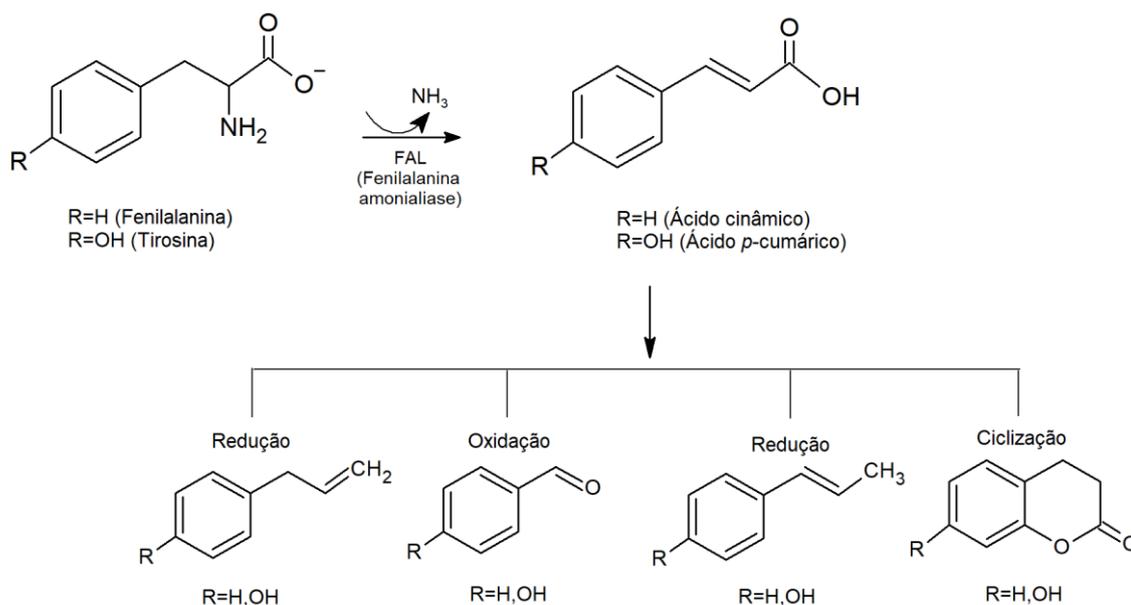


Figura 8 – Biossíntese de Fenilpropanoides. (Conclusão)



Fonte: Adaptado de Simões *et al.*, 2017

2.5. *Rosmarinus officinalis* (Alecrim)

A espécie *Rosmarinus officinalis*, conhecida vulgarmente como alecrim, é uma planta da família Lamiaceae e do género *Rosmarinus*. É um arbusto perene que pode alcançar de 0,5 a 1,5 metros de altura, apresentando folhas em forma de agulha. É originário de países mediterrâneos e cultivado em muitas partes do mundo (DIASS *et al.*, 2021). No Brasil, o alecrim (Figura 9) apresenta vários sinónimos: alecrim-de-cheiro, alecrim-das-hortas, alecrim-da-casa, alecrim-comum, alecrim-de-jardim, rosmaninho, entre outros (PORTE; GODOY, 2001).

Figura 9 – Aspecto geral da espécie *Rosmarinus officinalis*

Fonte: Do autor (2023)

O alecrim é uma erva medicinal bastante popular devido às suas propriedades terapêuticas, como analgésica, estimulante do Sistema Nervoso Central, diurética, antimicrobiana, cicatrizante, antioxidante, hepatoprotetora, anticonvulsiva, fortalecedora da memória, entre outras (RIBEIRO *et al.*, 2012; JIANG *et al.*, 2011). Essas propriedades fazem com que o alecrim seja amplamente utilizado em produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios, além de ser empregado na culinária como condimento devido ao seu sabor adocicado e suas propriedades antioxidantes (MACEDO *et al.*, 2020; PORTE; GODOY, 2001).

Os metabólitos secundários, como flavonoides, compostos fenólicos e terpenos, são os responsáveis por tais atividades biológicas do alecrim. (BAI *et al.*, 2010; MACEDO *et al.*, 2022). O óleo essencial extraído das folhas do alecrim apresenta como principais constituintes: 1,8-cineol, α -pineno, cânfora, canfeno, borneol, α -terpineol e β -cariofileno. Esses compostos isolados ou em sinergismo atribuem ao óleo essencial atividades antifúngicas, antivirais, antibacterianas, anti-inflamatória, antitumoral, antidepressivas, inseticida e antioxidantes (CAETANO *et al.*, 2022; AL ZUHAIRI *et al.*, 2020).

2.6. *Callistemon viminalis* (Escova-de-garrafa)

A espécie *Callistemon viminalis*, pertencente à família Myrtaceae, é uma árvore de porte médio, podendo alcançar de 3 a 7 metros de altura. É nativa da Austrália, porém está presente, também, na América do Sul e na Ásia tropical (OLIVEIRA *et al.*, 2015; OYEDEJI *et al.*, 2009). É popularmente conhecida como escova-de-garrafa (Figura 10), devido à sua inflorescência, que tem formato cilíndrico com numerosos estames sendo semelhante a uma escovinha.

Figura 10 – Aspecto geral da espécie *Callistemon viminalis*

Fonte: Do autor (2023)

Muitas espécies da família Myrtaceae são bem representadas no Brasil, sendo fonte de frutos comestíveis, temperos, plantas ornamentais e medicinais (OYEDEJI *et al.*, 2009). Os óleos essenciais das plantas da família Myrtaceae apresentam como constituintes os monoterpenos, fenilpropanoides e sesquiterpenos, em sua maioria. Esses compostos são os responsáveis pelas inúmeras atividades biológicas dessas plantas (SILVA *et al.*, 2010).

O gênero *Callistemon* engloba mais de 30 espécies de árvores e arbustos e a espécie *C. viminalis* tem sido alvo de estudos devido às suas propriedades biológicas (ZANDI-SOHANI; HOJJATI; CARBONELL-BARRACHINA, 2013). O óleo essencial da *C. viminalis* pode ser obtido das folhas, flores e galhos, sendo relatado na literatura que a composição química varia pouco do ponto de vista qualitativo, dependendo da parte utilizada para extração (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Os maiores rendimentos do óleo essencial são obtidos a partir das folhas, variando de 0,9 a 1,42% (LUNGUINHO *et al.*, 2021; SALES *et al.*, 2017).

Os principais constituintes comumente encontrados no óleo essencial de *C. viminalis* são: 1,8-cineol, α -pineno, α -terpineol e limoneno (LUNGUINHO *et al.*, 2021; SALES *et al.*, 2017). Esses constituintes do óleo essencial da escova-de-garrafa são responsáveis por algumas das suas propriedades biológicas, como atividade antibacteriana, antifúngica, inseticida, antitumoral e acaricida (OLIVEIRA *et al.*, 2015; PIRES *et al.*, 2013; SALES *et al.*, 2017; LUNGUINHO *et al.*, 2021).

2.7. Atividade antifúngica de óleos essenciais

A complexa e diversificada composição química dos óleos essenciais possibilita inúmeras atividades biológicas, entre elas propriedade antifúngica. E devido ao aumento da resistência dos microrganismos, os óleos essenciais têm sido alvo de pesquisas, por apresentarem várias interações com os fungos, dificultando o surgimento de cepas resistentes.

Os fungos são microrganismos eucarióticos e heterotróficos que estão presentes no solo, na água, nos vegetais, no ar e nos animais. Existe uma ampla variedade de espécies que, sob condições favoráveis, podem multiplicar-se nos alimentos, provocando a sua deterioração (FILHO; CALDAS; MURATORI, 2015). Porém, algumas espécies de fungo são desejáveis nos alimentos, como na produção de queijo e no processo fermentativo de vinhos e cervejas.

Os óleos essenciais podem atuar de diferentes formas sobre os fungos, devido à característica lipofílica dos seus constituintes, apresentando capacidade de interagir com a membrana plasmática dos fungos. Um dos principais mecanismos de ação dos óleos essenciais é o rompimento dessa membrana pela inibição na biossíntese de ergosterol, principal componente da membrana plasmática, responsável pelo desenvolvimento fisiológico e crescimento da célula fúngica (BRANDÃO *et al.*, 2021; HU *et al.*, 2017; TANG *et al.*, 2018).

Os compostos químicos dos óleos essenciais também podem alterar as atividades enzimáticas da célula fúngica, sua fluidez e ocasionar o extravasamento de íons e materiais celulares, podendo, assim, inibir o crescimento de esporos e deformar hifas (HU *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018). Além disso, os óleos essenciais apresentam capacidade de inibir a produção de micotoxinas, substâncias que são tóxicas e indesejáveis, principalmente nos alimentos.

Um estudo que comprovou o potencial fungicida de óleos essenciais foi desenvolvido por Brandão *et al.* (2021). Os autores avaliaram a atividade antifúngica e antimicotoxigênica do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre os fungos *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus*. A atividade antifúngica foi observada para os três fungos testados, obtendo um efeito fungicida sobre *A. carbonarius* em uma concentração de 0,24 $\mu\text{L mL}^{-1}$ do óleo essencial; já para *A. flavus* e *A. ochraceus*, a concentração do óleo foi de 0,98 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Além disso, o óleo essencial estudado apresentou, nas concentrações testadas, redução na síntese de ocratoxina A variando de 81,72 a 98,02% para as espécies fúngicas *A. carbonarius* e *A. ochraceus*. A produção de aflatoxina B1 e B2 foi inibida qualitativamente para *A. flavus*. Houve, ainda, uma diminuição significativa na biossíntese de ergosterol, mostrando a ação do óleo essencial sobre a membrana celular fúngica. O óleo essencial de *Lippia origanoides*

apresentou um alto potencial para uso como agente antifúngico e antimicotoxigênico sobre os fungos testados.

2.8. *Aspergillus*

Entre os fungos contaminadores de alimentos, em especial o café, podem-se destacar os fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicilium* e *Fusarium* (BATISTA *et al.*, 2016). O gênero *Aspergillus* é um dos patógenos mais preocupantes, devido à sua capacidade em produzir micotoxinas, as quais são responsáveis por doenças crônicas e agudas em animais e humanos. quando ingeridos (MILICEVIC; SKRINJAR; BALTIC 2010).

As espécies de *Aspergillus* podem ser encontradas em regiões de clima quente e suportam baixa atividade de água (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Elas são identificadas de acordo com suas diferenças morfológicas, como: tamanho, forma, textura e cor dos conídios. Quatro espécies de *Aspergillus* se destacam na produção da principal micotoxina estudada em grãos do café, a ocratoxina A, sendo elas *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus westerdijkiae* (BATISTA *et al.*, 2003; BORGES *et al.*, 2009).

A espécie *Aspergillus carbonarius* pertence ao gênero *Aspergillus*, seção Nigri e pode ser encontrada em alimentos de origem vegetal. Morfologicamente, o *A. carbonarius* produz conídios grandes e rugosos, com coloração preta. A temperatura ótima de desenvolvimento do fungo varia de 25 a 32 °C, e atividade de água (aw) entre 0,935-0,965 (OLIVEIRA *et al.*, 2019). No café, pesquisas de Chalfoun e Parizzi (2007), mostraram que *A. carbonarius* pode ser desenvolvido na etapa pós-colheita, tendo importância na produção da Ocratoxina A.

A espécie *Aspergillus niger* pertence ao gênero *Aspergillus*, seção Nigri, podendo ser encontrado em vários alimentos frescos e secos, especiarias e nos grãos e frutos do café. Esse fungo cresce a uma temperatura que varia entre 6 a 47 °C, apresentando como temperatura ótima valores entre 25 e 37 °C. Estudos de Magnani *et al.* (2005) demonstraram que o *A. niger* também é responsável pela síntese de ocratoxina A nos alimentos.

Os fungos *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus westerdijkiae* pertencentes ao gênero *Aspergillus*, seção Circumdati, podem ser encontrados em cereais e no café. Ambos têm seu crescimento em uma ampla faixa de temperatura, sendo a temperatura ótima valores entre 25 a 30 °C (MORELLO *et al.*, 2007). Atualmente, *A. westerdijkiae* é reconhecido como sendo a principal fonte de Ocratoxina A na espécie *Coffea arabica* (VIPOTNIK; RODRÍGUEZ; RODRIGUES, 2017).

2.9. Micotoxinas

As micotoxinas são compostos orgânicos formados pelo metabolismo secundário de alguns fungos filamentosos. O termo micotoxinas é geralmente empregado para fungos que contaminam produtos alimentícios e rações para animais. Existem cerca de 400 micotoxinas diferentes e elas podem ocorrer no campo na etapa de colheita, pós-colheita, ou ainda no processamento e armazenamento do alimento (ROCHA *et al.*, 2014).

As micotoxinas são produzidas quando os fungos atingem a maturidade; porém, o crescimento do fungo não implica formação das micotoxinas, visto que nem todas as espécies de fungos são produtoras de toxinas. Uma vez produzida, as micotoxinas podem permanecer no alimento até mesmo após a eliminação do microrganismo que as produziu, devido à sua alta resistência a tratamentos térmicos e processo de desidratação (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010).

As micotoxinas apresentam propriedades tóxicas para os seres humanos e animais, podendo essa contaminação ocorrer de forma direta ou indireta. A contaminação direta é quando se faz o consumo do alimento infectado pelo fungo toxigênico, responsável pela produção da micotoxina, como, por exemplo, em cereais, café, oleaginosas e frutos secos. Já a contaminação indireta é quando os animais se alimentam com rações previamente contaminadas, podendo excretar as micotoxinas no leite, carne e ovos (ROCHA *et al.*, 2014).

Aproximadamente 25% a 50% dos alimentos de origem agropecuária mundialmente estão contaminados com micotoxinas, de alguma forma. Entre as principais micotoxinas, têm-se: Aflatoxinas, Ocratoxina, Fumonisinias, Tricotecenos, Zearalenona, Citrinina e Patulina. A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Câncer – IARC) classifica a evidência de câncer a partir de diversos agentes biológicos, químicos e físicos. O Grupo 1 engloba os agentes cancerígenos para o homem; o Grupo 2B aqueles possivelmente cancerígenos para o homem; e o Grupo 3 são os agentes não classificáveis quanto à sua carcinogenicidade em seres humanos (Quadro 1).

Quadro 1 – Micotoxinas classificadas de acordo com a IARC

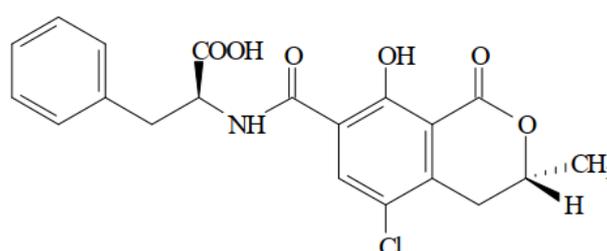
Micotoxina	Classificação - IARC
Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2)	Grupo 1
Ocratoxina A, Aflatoxina (B1 e B2), Esterigmatocistina, Fumonisinias	Grupo 2B
Citrinina, Zearalenona, Patulina, Tricotecenos	Grupo 3

Fonte: IARC, 2012

2.10. Ocratoxina A

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por fungos filamentosos que contaminam vários produtos alimentícios, como: cereais, café, uva, vinho, cerveja, cacau e especiarias. Ela foi descoberta em 1965 como um metabólito secundário de *Aspergillus ochraceus*, sendo as espécies do gênero *Aspergillus* a principal produtora dessa micotoxina e das aflatoxinas, afetando a segurança alimentar (MERWE *et al.*, 1965). A estrutura química da OTA (Figura 11) apresenta uma β -fenilalanina ligada por ligação amida a uma isocumarina.

Figura 11 – Estrutura química da Ocratoxina A



Fonte: Do autor (2023)

A OTA foi classificada pela IARC (2012) como potencial carcinogênico humano do Grupo 2B, causando danos aos rins e podendo desenvolver tumores no trato urinário. Pesquisas de Kruger *et al.* (2015) mostraram que a OTA pode apresentar propriedades neurotóxicas, hepatotóxicas, teratogênicas, imunotóxicas e cancerígenas que, dependendo da concentração e tempo de exposição à toxina, pode desenvolver câncer no fígado, rins, glândulas mamárias e testículos em animais.

Vários países têm criado legislações para definir a concentração máxima dessa toxina em produtos alimentícios, com a finalidade de assegurar a segurança alimentar e conseqüentemente a saúde humana (JANIK *et al.*, 2020). No Brasil, foram estabelecidos limites máximos para OTA em alimentos: café torrado, feijão e frutas secas e desidratadas $10 \mu\text{g kg}^{-1}$; cereais e produtos de cereais $20 \mu\text{g kg}^{-1}$; vinho e seus derivados $2 \mu\text{g kg}^{-1}$; produtos de cacau e chocolate $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ (BRASIL, 2011 e 2017).

No café, a OTA pode ser produzida pelos fungos *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. westerdijkiae* (FERRAZ *et al.*, 2009). A fase de colheita e secagem dos grãos são as principais etapas em que pode ocorrer a contaminação fúngica. As condições ambientais, como umidade e temperatura, também podem favorecer a produção de micotoxinas. A casca do café pode ser considerada a principal parte do fruto na qual ocorre o desenvolvimento dos fungos;

logo, quando removida, diminui significativamente os microrganismos ali presentes (CHALFOUN; BATISTA, 2006).

Passamani *et al.* (2014) avaliaram a influência da temperatura, atividade de água e pH no desenvolvimento e produção de OTA por cepas de *A. carbonarius* e *A. niger*. Observou-se para *A. niger*, temperaturas entre 24 e 37 °C, atividade de água superior a 0,95 e pH entre 4 e 6,5, foram ideais para o seu crescimento. Para *A. carbonarius*, o maior crescimento foi na faixa de temperatura de 20 a 33 °C, atividade de água entre 0,95 e 0,98, e pH entre 5 e 6,5. Na síntese da toxina, a maior concentração obtida para *A. niger* e *A. carbonarius* foi de 7,0 e 10 µg g⁻¹, respectivamente, encontradas a 15 °C, 0,99 de atividade de água e com pH = 5,35. Os resultados mostraram que o efeito da interação entre a temperatura e a atividade de água foram antagônicos na produção da ocratoxina A, pois a menor temperatura e a maior atividade de água foram as condições de maior síntese. Além disso, saber as condições ideais em que ocorre a produção de toxinas pelos microrganismos permite uma avaliação para garantir a segurança do alimento.

2.11. Nanofibras

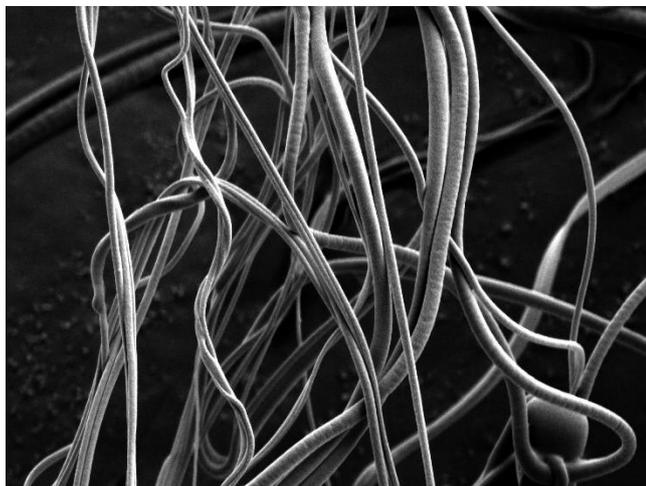
A nanotecnologia é uma área de grande crescimento devido à sua multidisciplinaridade. Ela tem como objetivo o desenvolvimento e aplicação de novos materiais, dispositivos e estruturas com pelo menos uma dimensão em escala nanométrica (HÖLAND *et al.*, 2009). A necessidade de redução da escala dos materiais permite uma maior superfície de contato, possibilitando, assim, que esse material apresente melhores desempenhos, tais como: melhores propriedades químicas, catalíticas, magnéticas, ópticas e, ainda, intensificação das atividades biológicas. Dessa forma, os nanomateriais podem ser aplicados nas indústrias alimentícia, biomédica, farmacêutica, cosmética, agroquímica entre outras (BARBIEUX, D.; PADULA, 2018; YU *et al.*, 2018).

O encapsulamento de substâncias em nanofibras, nanopartículas, nanoemulsões e nanocristais, por exemplo, fornece vários benefícios, como a liberação controlada de compostos, proteção do princípio ativo de agressões ambientais e de reações de deterioração; além disso, permite disfarçar odores, sabores e texturas (MEDEIROS *et al.*, 2009).

As nanofibras (Figura 12) são formadas por polímeros dispostos em longos filamentos que apresentam pelo menos uma dimensão em escala nanométrica. Elas se destacam, pois apresentam uma área de superfície maior em relação ao volume, e suas fibras podem ser conectadas entre si na forma de estruturas planas, flexíveis e porosas (MEDEIROS *et al.*, 2009). Além disso, as nanofibras apresentam várias características de interesse, como:

biocompatibilidade, biodegradabilidade, alta porosidade e viabilidade em liberar substâncias ativas (MORIE *et al.*, 2014).

Figura 12 – Aspecto geral da nanofibra



Fonte: Do autor (2023)

As nanofibras têm sido alvo de estudos para aplicação na área de alimentos, agricultura e farmacêutica. Elas podem ser empregadas como conservante de alimento, como um material de embalagem ativa para evitar contaminação fúngica e como sensores ou fertilizantes na agricultura, para avaliar a maturação de frutas e controlar a liberação de substâncias na lavoura (BRANDÃO *et al.*, 2023; SILVA *et al.*, 2022; NATARELLI *et al.*, 2021). Na área farmacêutica, as nanofibras podem ser aplicadas como curativos para cicatrização de feridas, entrega de moléculas bioativas, aumento de solubilidade, entre outras aplicações (HAJIALI *et al.*, 2016; LUO *et al.*, 2021; PATROJANASOPHON *et al.*, 2020).

Diante da ampla gama de aplicações das nanofibras em diferentes áreas, é notório que o desenvolvimento de novos produtos com sistemas nanométricos tem grande potencial. Com isso, pensando na melhoria da segurança alimentar, as nanofibras tem sido promissora no controle de fungos micotoxigênicos devido à distribuição e liberação controlada de agentes antifúngicos, em que a incorporação de compostos ativos voláteis, como os óleos essenciais, é uma boa alternativa aos fungicidas sintéticos.

2.12. Produção de nanofibras

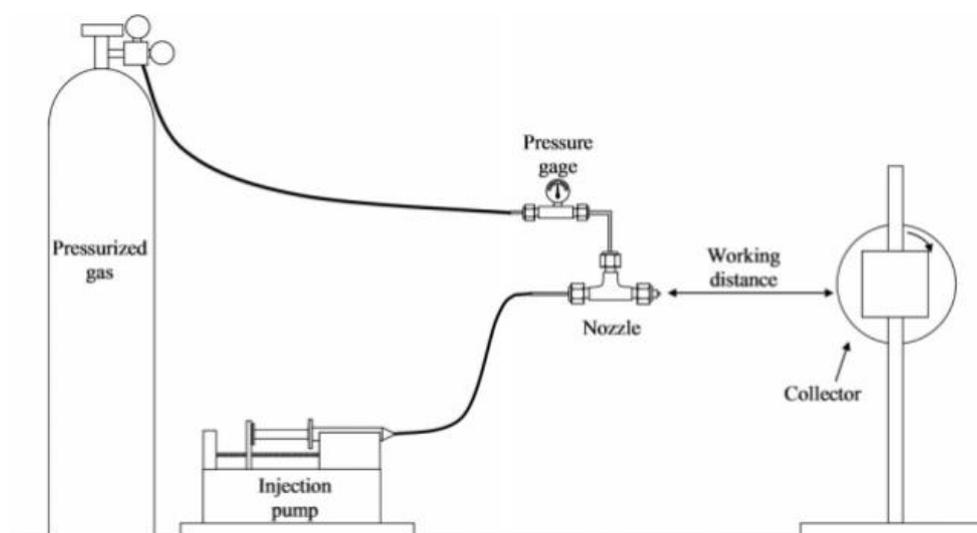
As nanofibras podem ser produzidas a partir de polímeros naturais ou sintéticos, ou ainda, através de materiais à base de carbono, semicondutores, entre outros. As técnicas para a produção das fibras incluem a fiação através do polímero em solução (*melt blowing*), a fiação em estado fundido (*melt spinning*), a eletrofiação e a fiação por sopro em solução ou *solution blow spinning* (SBS). Está última técnica foi desenvolvida por Medeiros *et al.* (2009), com o

intuito de fabricar fibras com diâmetro que variasse na faixa de 1nm a 1 μ m e que pudessem ser produzidas em escala comercial de forma mais simples.

A SBS é uma técnica inovadora, podendo ser aplicada com diversas finalidades e apresenta uma boa compatibilidade com vários tipos de polímeros e solventes. Além disso, é considerada uma técnica de baixo custo de manutenção, tem alta produção de nanofibras e maior praticidade, se comparada a outras (MEDEIROS *et al.*, 2009).

A SBS se fundamenta no uso de uma força aerodinâmica, por meio de um gás pressurizado (nitrogênio, argônio ou ar comprimido). A solução polimérica é injetada no bocal com uma corrente de gás acelerada, ou seja, ela é forçada através de um tubo interno até formar uma gota na ponta do bocal, que é deformada em formato de cone pelo jato de ar oriundo do tubo externo. Essa força de arraste provocada pelo jato de ar faz com que o material polimérico seja estendido até o coletor e forme as micro e/ou nanofibras, as quais se depositam umas sobre as outras (OLIVEIRA *et al.*, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2009). A Figura 13 mostra a representação esquemática da técnica SBS.

Figura 13 – Representação esquemática da fiação por sopro em solução (SBS)



Fonte: Medeiros, 2009

Vários parâmetros podem interferir na formação das nanofibras, alterando o valor do seu diâmetro e morfologia. A concentração da solução polimérica, bem como o tipo de polímero a ser utilizado, podem afetar diretamente no diâmetro médio da fibra, sendo o aumento da concentração diretamente proporcional ao tamanho do diâmetro. Outros parâmetros, como: pressão de arraste do gás, taxa de injeção da solução polimérica e distância de trabalho (ponta do tubo interno até o coletor), também podem afetar na uniformidade das fibras, na quantidade

de produção, na facilidade do processamento, bem como no diâmetro e morfologia (DARISTOTLE *et al.*, 2016; MEDEIROS *et al.*, 2009).

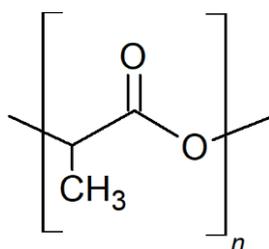
2.13. Poli (ácido láctico)

Os materiais nanométricos podem ser sintetizados a partir de diversas matérias-primas e por técnicas distintas. A composição que mais se destaca são as poliméricas, principalmente os polímeros biodegradáveis, devido ao interesse em compostos para aplicações em fármacos, cosméticos e alimentos. A escolha do polímero deve levar em conta características específicas de cada material, como biodegradabilidade, biocompatibilidade, estabilidade química, propriedades térmicas e mecânicas (DIMER *et al.*, 2013). Entre os polímeros mais frequentemente utilizados, podem-se destacar os poliésteres alifáticos, como o poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) PGA e poli (ϵ -caprolactona) PCL (OKADA, 2002).

O PLA é um termoplástico proveniente do ácido láctico (ácido 2-hidroxipropanoico), apresentando como principais características: biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade, podendo ser empregado em embalagens alimentícias até implantes médicos. O PLA é geralmente produzido pela policondensação do ácido láctico (BRANDÃO *et al.*, 2023; SAINI; ARORA; RAVI KUMAR, 2016).

O ácido láctico é comumente obtido por fermentação, usando fontes renováveis como milho, cana-de-açúcar e trigo, mas também pode ser produzido por via sintética. No processo fermentativo, o açúcar é convertido em ácido láctico pelo auxílio de cepas de bactéria *Lactobacillus*. (GUPTA; REVAGADE; HILBORN, 2007). Além disso, o ácido láctico é uma molécula quiral, apresentando dois enantiômeros L e D-ácido láctico.

Figura 14 – Estrutura química do PLA



Fonte: Do autor (2023)

A degradação do PLA ocorre por hidrólise simples da ligação éster, ocasionando uma redução sucessiva do peso molecular, não sendo necessária a presença de enzimas para catalisar a hidrólise. Já a degradação térmica ocorre em temperaturas acima de 200 °C (RASAL; JANORKAR; HIRT, 2010). Os produtos da degradação não são tóxicos, fortalecendo o seu uso em aplicações alimentícia, biomédica, cosmética e farmacológica. Além disso, o PLA é

considerado um polímero de fácil processamento, proporcionando boa rigidez e resistência mecânica (CHEN; TSAI; YANG, 2011).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A incorporação dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* e *Callistemon viminalis* em matriz polimérica de nanofibras se mostrou eficaz no controle dos fungos patogênicos, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus westerdjikiae*. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se inferir que os óleos essenciais estudados e as nanofibras incorporadas com óleo essencial apresentaram valores significativos na atividade antifúngica e antimicotoxigênica.

O encapsulamento de óleos essenciais, atrelado ao tratamento pelo método de fumigação, podem ser considerados potenciais nos setores agrícolas e de alimentos, por meio da fumigação, sendo possível prevenir o crescimento de microrganismos e produção de micotoxinas, sem entrar em contato direto com o alimento, deixando o mínimo de resíduos. Portanto, a nanoencapsulação de óleo essencial tem se mostrado como importante aliada na aplicação nanotecnológica, aumentando a eficiência dos compostos, bem como evitando sua degradação a curto prazo.

REFERÊNCIAS

- AL ZUHAIRI, J. J. M. J. *et al.* Antioxidant, cytotoxic and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil against bacteria isolated from urinary tract infection. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 38, 101192, 2020.
- BAI, N. *et al.* Flavonoids and Phenolic Compounds from *Rosmarinus officinalis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n.9, p. 5363–5367, 2010.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n.2, p. 446–475, 2008.
- BARBIEUX, D.; PADULA, A. D. Paths and challenges of new technologies: the case of nanotechnology-based cosmetics development in Brazil. **Administrative Sciences**, v. 8, n. 2, p. 16, 2018.
- BATISTA, L. R. *et al.* Coffee: Types and Production. **Encyclopedia of Food and Health**, p.244- 251, 2016.
- BATISTA, L. R. *et al.* Toxigenic fungi associated with processed green coffee beans (*Coffea Arabica* L.). **International Journal of food Microbiology**, v. 85, p. 293-300, 2003.
- BORGES, J. G. *et al.* Fungos toxigênicos em grãos de café armazenados. **In: Simpósio de Pesquisa dos cafés do Brasil**, Anais de Brasília, DF: Embrapa – Café, 3p., 2009.
- BRANDÃO, R. M. *et al.* Antifungal activity and the effect of the essential oil of *Lippia origanoides* Kunth on *Aspergillus* mycotoxins production. **Australian Journal of Crop Science**, v. 15, n. 7, p. 1005-1012, 2021.
- BRANDÃO, R. M. *et al.* *In vitro* and *in vivo* efficacy of poly(lactic acid) nanofiber packaging containing essential oils from *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. against *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* in table grapes. **Food Chemistry**, v. 400, p. 134087, 2023.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Diário oficial da união. Resolução - RDC Nº - 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**, 2011.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Diário oficial da união. Resolução - RDC Nº - 138 de 8 de fevereiro de 2017. **Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**, 2017.
- BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. **American Society of Plant Physiologists**, 2 ed., Editora: John Wiley & Sons, 1280 p., 2015.
- CAETANO, A. R. S. *et al.* *Rosmarinus officinalis* essential oil incorporated into nanoparticles as an efficient insecticide against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Austral Entomology**, v. 61, n. 2, p. 265 – 272, 2022.

- CARNEIRO, J. N. P. *et al.* GC/MS analysis and antimicrobial activity of the *Piper mikanianum* (Kunth) Steud. essential oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 135, 110987, p. 1-8, 2019.
- CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. Incidência de ocratoxina A em diferentes frações de grãos de café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, 2006.
- CHALFOUN, S.; PARIZZI, F. Fungos toxigênicos e micotoxinas em café. In: **Pós-colheita do café**. Lavras: Editora UFLA, p. 513-543, 2007.
- CHEN, H.; TSAI, C.; YANG, M. Mechanical properties and biocompatibility of electrospun polylactide/poly (vinylidene fluoride) mats. **Journal of Polymer Research**, v. 18, n. 3, p. 319-327, 2011.
- DARISTOTLE, J. L. *et al.* A Review of the Fundamental Principles and Applications of Solution Blow Spinning. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 51, p. 34951–34963, 2016.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. Chichester: J. Wiley, 539 p, 2009.
- DIASS, K. *et al.* Biological and pharmaceutical properties of essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula officinalis* L. **Materials Today: Proceedings**, v. 45, p. 7768 – 7773, 2021.
- DIMER, F. A. *et al.* Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.
- FERRAZ, M. B. M. *et al.* Kinetics of ochratoxin A destruction during coffee roasting. **Food control**, v. 21, p.873, 2009.
- FILHO, F. C. C.; CALDAS, M. L.; MURATORI, M. C. S. Fungos e aflatoxinas em cereais: uma revisão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 2, n. 2, p. 122-130, 2015.
- FUMAGALI, E. *et al.* Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p. 627–641, 2008.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GUPTA, B.; REVAGADE, N.; HILBORN, J. Poly(lactic acid) fiber: An overview. **Progress in Polymer Science**, v.32, n.4, p.455–482, 2007.
- HAIJALI, H. *et al.* Alginate-lavender nanofibers with antibacterial and anti-inflammatory activity to effectively promote burn healing. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 9, p. 1686-1695, 2016.

HÖLAND, W. *et al.* Future perspectives of biomaterials for dental restoration. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 29, n. 7, p. 1291-1297, 2009.

HU, Y. *et al.* Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. **Food chemistry**, v. 220, p. 1-8, 2017.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 7, p. 138-161, 2010.

IARC - International Agency for Research on Cancer. Chemical agents and related occupations. **IARC Monographs on the evaluation carcinogenic risks to humans**. 100F:225-244, 2012.

JANIK, E. *et al.* Molecular aspects of mycotoxins-A serious problem for human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n.21, 8187, 2020.

JIANG, Y. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.32, n.1, p. 63 – 68, 2011.

KRUGER, C. D. *et al.* Níveis séricos de ocratoxina A e lesões em suínos no Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 37, n. 3, p. 198-202, 2015.

LÜCKER, J. **Metabolic engineering of monoterpene biosynthesis in plants**. Wageningen: Proefschrift Wageningen University, 158 p., 2002.

LUNGUINHO, A. S. *et al.* Acaricidal and repellent activity of the essential oils of *Backhousia citriodora*, *Callistemon viminalis* and *Cinnamodendron dinisii* against *Rhipicephalus* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 300, p. 109594, 2021.

LUO, S. *et al.* Fabrication and characterization of dextran/zein hybrid electrospun fibers with tailored properties for controlled release of curcumin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 15, p. 6355-6367, 2021.

MACEDO, L. M. *et al.* Development and evaluation of an antimicrobial formulation containing *Rosmarinus officinalis*. **Molecules**, v. 27, 5049, 2022.

MACEDO, L.M. *et al.* Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L., syn *Salvia rosmarinus* Spenn.) and its topical applications: A Review. **Plants**, v. 9, 651, 2020.

MAGNANI, M. *et al.* Molecular Identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 1, p. 45-49, 2005.

MEDEIROS, E. S. *et al.* Solution blow spinning: A new method to produce micro- and nanofibers from polymer solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, v.113, n.4, p.2322–2330, 2009.

MERWE, K. J. V. *et al.* Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. **Nature**, London, v. 205, p. 1113, 1965.

MILICEVIC, D. R.; SKRINJAR, M.; BALTIC, T. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. **Toxins**, Basel, v. 2, n. 4, p. 572-592, 2010.

MORELLO, L. G. *et al.* Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of beta-tubulin gene by using real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 270-276, 2007.

MORIE, A. *et al.* Nanofibers as novel drug carrier—an overview. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 135-143, 2014.

MUTLU-INGOK, A. *et al.* Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic and antioxidant activities of essential oils: An updated review. **Molecules**, v.25, n. 4711, p.1-49, 2020.

NATARELLI, C. V. L. *et al.* Zinc slow-release systems for maize using biodegradable PBAT nanofibers obtained by solution blow spinning. **Journal of Materials Science**, v. 56, n. 7, p. 4896-4908, 2021.

OKADA, M. Chemical syntheses of biodegradable polymers. **Progress in Polymer Science**, v.27, n.1, p. 87-133, 2002.

OLIVEIRA, C. M. *et al.* Chemical characterization and in vitro antitumor activity of the essential oils from the leaves and flowers of *Callistemon viminalis*. **American Journal of Plant Sciences**, v. 06, p. 2664-2671, 2015.

OLIVEIRA, G. *et al.* Influence of temperature and water activity on Ochratoxin A production by *Aspergillus* strain in coffee south of Minas Gerais/Brazil. **LWT**, v. 102, p. 1-7, 2019.

OLIVEIRA, J. E. *et al.* Nano and submicrometric fibers of poly(D,L-Lactide) obtained by solution blow spinning: Process and solution variables. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 122, n.5, p.3396–3405, 2011.

OLIVEIRA, M. M. M. *et al.* Morphological alter-ations in sessile cells of *Listeria monocytogenes* after treatment with *Cymbopogon* sp. essential oils. **Magistra**, v. 26, n. 3, p. 385-392, 2014.

OYEDEJI, O. O. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Callistemon citrinus* and *Callistemon viminalis* from South Africa. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 1990-1998, 2009.

PASSAMANI, F. R. F. *et al.* Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes. **Journal of food protection**, v. 77, n. 11, p. 1947-1952, 2014.

PATROJANASOPHON, P. *et al.* Influence of nanofiber alignment on the release of a water-soluble drug from cellulose acetate nanofibers. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 10, p. 1210-1216, 2020.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

- PIRES, C.H. *et al.* Composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas e flores de *Callistemon viminalis* (sol. ex Gaertn.) G. Don ex. Loudon (Myrtaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, p. 597-601, 2013.
- PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 19, n. 2, p.193-210, 2001.
- RASAL, R. M.; JANORKAR, A. V.; HIRT, D. E. Poly(lactic acid) modifications. **Progress in Polymer Science**, v.35, n.3, p.338–356, 2010.
- REZENDE, D. A. C. S. *et al.* Characterization of the Biological Potential of the Essential Oils from Five Species of Medicinal Plants. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, p. 154-170, 2017.
- RIBEIRO, D. S. *et al.* Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 687 – 696, 2012.
- ROCHA, M. E. B. *et al.* Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, n.1, p. 159 – 165, 2014.
- SAINI, P.; ARORA, M.; RAVI KUMAR, M. N. V. Poly (lactic acid) blends in biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 47-59, 2016.
- SALES, T. A. *et al.* Essential Oils from the Leaves and Flowers of *Callistemon viminalis*: Chemical Characterization and Evaluation of the Insecticide and Antifungal Activities. **American Journal of Plant Sciences**, v. 08, p. 2516-2529, 2017.
- SILVA, C. J. *et al.* Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of Myrtaceae species planted in Brazil. **Química Nova**, v. 33, n.1, p.104-108, 2010.
- SILVA, V. D. *et al.* Fruit ripeness sensors based on poly (lactic acid)/polyaniline solution blow-spun fibrous membranes. **Journal of Applied Polymer Science**, p. 52386, 2022.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1 ed. Artmed, 502 p. 2017.
- TANG, X. *et al.* Antifungal activity of essential oil compounds (geraniol and citral) and inhibitory mechanisms on grain pathogens (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*). **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2108, 2018.
- TEIXEIRA, M. L. Óleos essenciais de *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) e *Lippia origanoides* Kunth.: composição química, atividade antioxidante e potencial farmacológico. 2016. 191 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12 ed., Editora: Artmed, 964 p, 2017.

VIPOTNIK, Z.; RODRÍGUEZ, A.; RODRIGUES, P. *Aspergillus westerdijkiae* as a major ochratoxin A risk in dry-cured ham based-media. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 244-251, 2017.

WANG, L. *et al.* Effect of cinnamaldehyde on morphological alterations of *Aspergillus ochraceus* and expression of key genes involved in ochratoxin A biosynthesis. **Toxins**, v. 10, n. 9, p. 340, 2018.

YU, H. *et al.* An overview of nanotechnology in Food Science: preparative methods, practical applications, and safety. **Journal of Chemistry**, v. 2018, 5427978, 10 p., 2018.

ZANDI-SOHANI, N; HOJJATI, M.; CARBONELL-BARRACHINA, Á. A. Insecticidal and Repellent Activities of the Essential Oil of *Callistemon citrinus* (Myrtaceae) Against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae), **Neotropical Entomology**, v. 42, n.1, p.89-94, 2013.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 - Efeito antifúngico e antiocrotogênico do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* e *Callistemon viminalis* sobre fungos do gênero *Aspergillus*

**Artigo redigido nas normas da revista para submissão
Periódico: *Letters in Applied Microbiology*.
JCR: 2.858.**

Efeito antifúngico e antiocratogênico do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* e *Callistemon viminalis* sobre fungos do gênero *Aspergillus*

Running Head: Ação antifúngica de óleos essenciais

Carolina Salles Freire^a, Maria das Graças Cardoso^{a*}, Eduardo Alves^b, Gabriela Aguiar Campolina^c, Gislaine Cristina Peixoto de Carvalho^a, Luís Roberto Batista^c

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil.

^b Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil.

^c Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil.

*Autor correspondente: Maria das Graças Cardoso, Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras (UFLA), CEP 37200-900, Lavras, Minas Gerais, Brasil, E-mail: mcardoso@ufla.br

Significado e impacto do estudo:

A contaminação de alimentos por fungos micotoxigênicos tem causado perdas em todo o mundo. O estudo aborda uma alternativa natural para inibição do crescimento de fungos do gênero *Aspergillus* e também da produção de micotoxinas. Resultados importantes em relação às atividades antifúngica e antiocrotaxigênica dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* e *Callistemon viminalis* foram obtidos. Além disso, alterações morfológicas nos microrganismos após os tratamentos foram demonstradas. Pelos resultados, infere-se que a viabilidade de aplicação dos óleos essenciais estudados na conservação de alimentos, bem como na proteção de culturas agrícolas (café, cereais, uva e especiarias) garantindo a segurança alimentar.

Resumo

Os constituintes químicos dos óleos essenciais exibem atividades biológicas significativas, podendo ser utilizados para inibir insetos, fungos e bactérias. Objetivou-se neste estudo extrair, caracterizar os óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* e *Callistemon viminalis* e avaliar o potencial antifúngico e antiocrotaxigênico destes sobre *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus westerdijkiae*. Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação e caracterizados por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC/MS) e Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chamas (GC/FID). As atividades antifúngicas e antiocrotaxigênica foram determinadas pelo método de fumigação. A Microscopia Eletrônica de Varredura foi utilizada para analisar os efeitos dos óleos essenciais na membrana celular dos fungos. Os compostos majoritários encontrados foram 1,8-cineol e cânfora (*R. officinalis*) e 1,8-cineol e α -pineno (*C. viminalis*). O crescimento micelial dos fungos em estudo foi inibido significativamente pelos óleos essenciais e pelo 1,8-cineol para as concentrações testadas. Uma redução na síntese de ocratoxina A para os fungos em estudo, foi observada na presença dos óleos essenciais e do 1,8-cineol. Foram obtidos, por meio das eletromicrografias, efeitos deletérios na morfologia dos fungos após os tratamentos. Os resultados sugerem que os óleos essenciais de *R. officinalis* e *C. viminalis* apresentam potencial antifúngico e antiocrotaxigênico sobre os fungos toxigênicos que contaminam os alimentos.

Palavras-chave: Atividade antifúngica; *Rosmarinus officinalis*; *Callistemon viminalis*; micotoxinas; *Aspergillus* sp.

Introdução

A contaminação de alimentos é uma grande ameaça à segurança alimentar, sendo um problema em nível mundial, colocando em risco a saúde humana e animal. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que cerca de 600 milhões de pessoas por ano adoecem por consumirem alimentos contaminados (FAO e WHO 2018). Espécies fúngicas estão entre umas das principais causas de contaminação nos alimentos, levando à sua deterioração. Esses microrganismos ainda são capazes de produzir micotoxinas (SILVA *et al.* 2020).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos, sendo o gênero *Aspergillus* um dos principais produtores. Elas apresentam elevada toxicidade, causando problemas agudos e crônicos para a saúde humana e animal, além de resultar em perdas econômicas. Nos alimentos, a produção de micotoxinas pode ocorrer no solo durante a colheita, no processamento, estocagem e transporte (BRANDÃO *et al.* 2021). Entre as micotoxinas produzidas pelo gênero *Aspergillus*, destacam-se as aflatoxinas e a ocratoxina A (OTA), sendo consideradas cancerígenas e possivelmente cancerígenas para humanos, respectivamente, segundo a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Câncer – IARC) (IARC 2012).

Aspergillus ochraceus, *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus westerdijkiae* produzem a OTA em uvas, café, vinho e cereais. Diversas medidas têm sido aplicadas para prevenir e controlar o crescimento desses fungos, bem como inibir a produção de micotoxinas. O uso de produtos químicos sintéticos é a forma mais comum para reduzir a contaminação dos alimentos. Porém, o uso contínuo e exacerbado desses produtos sintéticos pode aumentar o risco de resíduos tóxicos nos alimentos e no meio ambiente, podendo causar a resistência dos microrganismos (HUA *et al.* 2014, MOON *et al.* 2016).

A busca por métodos alternativos aos aditivos químicos sintéticos coloca em destaque os recursos naturais. Os óleos essenciais, formados por uma mistura complexa de compostos orgânicos, destacam-se por apresentarem atividades biológicas comprovadas (BAKKALI *et al.* 2008). A diversificada composição química dos óleos essenciais garante potencial fungicida e bactericida, dificultando a seleção de patógenos resistentes (BRANDÃO *et al.* 2020, CAMARGO *et al.* 2020). Além disso, os óleos essenciais apresentam menor toxicidade se comparada às substâncias sintéticas, com relativa segurança alimentar, pois seus compostos

químicos são, na sua maioria, classificados como agentes geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA).

Entre as inúmeras plantas produtoras de óleos essenciais, *Rosmarinus officinalis*, pertencente à família Lamiaceae, e *Callistemon viminalis*, pertencente à família Myrtaceae, apresentam constituintes que são biologicamente ativos, despertando grande interesse na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. Objetivou-se no presente estudo extrair e caracterizar quimicamente o óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis*, avaliar a atividade antifúngica e antimicotoxigênica sobre *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae*, bem como analisar seus efeitos na morfologia de ambos os fungos.

Resultados e Discussão

Teor de Umidade, Rendimento e Caracterização Química dos Óleos Essenciais

O teor de umidade e o valor do rendimento dos óleos essenciais extraídos de *R. officinalis* e *C. viminalis* estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1.

De acordo com os dados descritos na Tabela 1, observa-se que o rendimento dos óleos essenciais em base livre de umidade de *R. officinalis* e *C. viminalis* foram de 0.85% e 1.02%, respectivamente.

Moussii *et al.* (2020) e Al Zuhairi *et al.* (2020), estudando o óleo essencial das folhas frescas de *R. officinalis*, obtiveram como rendimento 1.35% e 0.98%, respectivamente. Tais valores foram maiores do que o encontrado no presente estudo. Sales *et al.* (2017) e Lunguinho *et al.* (2021), por sua vez, avaliando o rendimento do óleo essencial de *C. viminalis*, obtiveram 1.14% e 0.94%, respectivamente, valores que corroboram com aqueles obtidos no presente estudo.

A composição química dos óleos essenciais de *R. officinalis* e *C. viminalis* está apresentada na Tabela 2. Foram identificados 16 constituintes químicos para *R. officinalis* e 11 constituintes químicos para *C. viminalis*.

Tabela 2.

Os constituintes majoritários do óleo essencial de *R. officinalis* foram 1,8-cineol (49.24%), seguido de cânfora (17.28%), α -pineno (8.24%) e borneol (5.33%). Os principais componentes do óleo essencial de *C. viminalis* foram 1,8-cineol (56.70%), α -pineno (15.32%), limoneno (8.60%) e α -terpineol (6.50%). O óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis*

apresentaram constituintes semelhantes, diferindo nas porcentagens e nos compostos presentes em menores quantidades.

Os dados obtidos para o óleo essencial de *R. officinalis*, corroboram com aqueles encontrados por Rezende *et al.* (2017), que estudaram o óleo essencial de *R. officinalis* e encontram os mesmos componentes principais, porém em concentrações diferentes, sendo 62.26% de 1,8-cineol; 17.34% de cânfora; e 9.07% de α -pineno. Al Zuhairi *et al.* (2020), estudando o óleo essencial de *R. officinalis* identificaram 10 compostos, sendo os majoritários 1,8-cineol (17.16%), α -pineno (16.95%) e verbenona (15.78%), divergindo na porcentagem e em alguns compostos encontrados no presente estudo.

Lunguinho *et al.* (2021) avaliaram os principais constituintes do óleo essencial de *C. viminalis* e obtiveram como resultado 1,8-cineol (78.10%), α -pineno (12.50%) e limoneno (3.36%). Esses compostos corroboram com os encontrados neste estudo, tendo variação nas porcentagens. Sales *et al.* (2017) também estudaram o óleo essencial de *C. viminalis* obtendo como constituintes majoritários 1,8-cineol (84.60%), α -pineno (10.28%) e α -terpineol (2.59%).

Essas diferenças observadas nos valores de rendimento e na caracterização química dos óleos essenciais no presente estudo podem ser explicadas por diversos fatores, como: local, época e hora da coleta do material vegetal. Além disso, o tipo de solo e nutrientes presentes ali interferem na produção dos metabólitos secundários da espécie. O estágio de desenvolvimento da planta, umidade do local, temperatura e outros fatores também podem influenciar na biossíntese dos metabólitos secundários (GOBBO-NETO e LOPES 2007).

Atividade Antifúngica

O efeito das diferentes concentrações do óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis* e do monoterpeneo 1,8-cineol no crescimento micelial dos fungos *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae* é mostrado na Figura 1. Os resultados indicaram um efeito fungistático, em que as menores concentrações apresentaram inibição significativa no crescimento micelial ($p < 0.05$), quando comparado ao efeito do controle negativo.

Para o fungo *A. ochraceus*, todos os tratamentos apresentaram inibição do crescimento micelial. Na maior concentração estudada ($3000 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$), o óleo essencial de *C. viminalis* apresentou maior porcentagem de inibição (68.89%), porém não houve diferença estatística com o monoterpeneo 1,8-cineol (66.30%). Já o óleo essencial de *R. officinalis* diferiu estatisticamente de *C. viminalis*, apresentando uma porcentagem de inibição micelial de 65.00%.

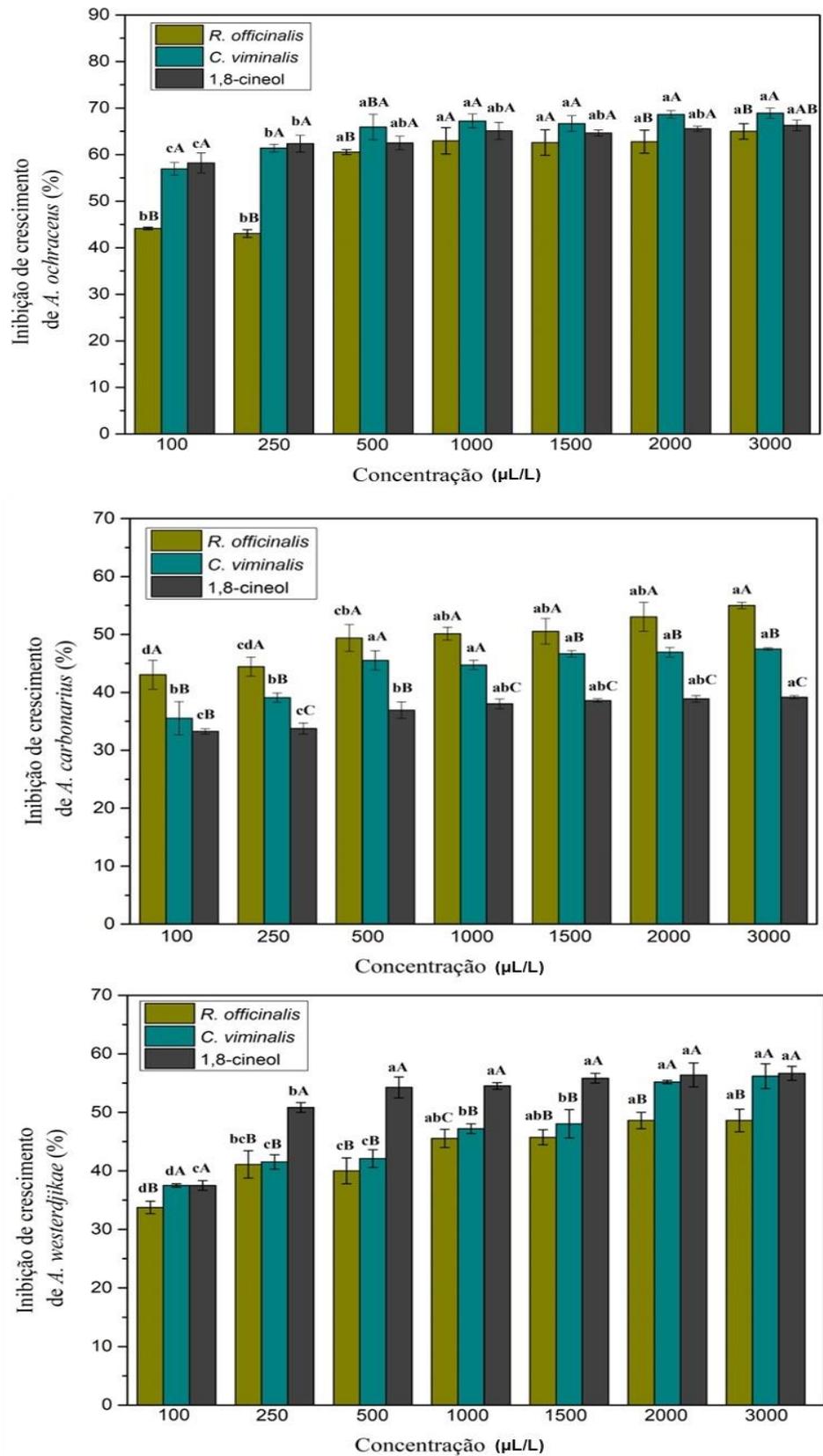


Figura 1. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae* sobre efeito dos óleos essenciais de *R. officinalis* e *C. viminalis* e do monoterpeneo 1,8-cineol: Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as

concentrações testadas em cada tratamento e letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os três tratamentos, de acordo com o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O fungo *A. carbonarius* foi mais sensível ao tratamento com óleo essencial de *R. officinalis*, apresentando 55% de inibição do crescimento micelial para a concentração de 3000 $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$. Este valor diferiu estatisticamente dos tratamentos com óleo essencial de *C. viminalis* (47.50%) e com o monoterpeneo 1,8-cineol (39.17%). No teste de inibição do crescimento micelial para *A. westerdjkiae*, pode-se observar que o monoterpeneo 1,8-cineol e o óleo essencial *C. viminalis* apresentaram, estatisticamente, as maiores porcentagens de inibição, 56.67% e 56.18%, respectivamente, para a maior concentração estudada.

Tais resultados para as três espécies de *Aspergillus* mostram que as concentrações estudadas pelo método de fumigação não foram dose-dependente a cada aumento da concentração, demonstrando que trabalhar em concentrações menores garante porcentagens significativas de inibição do crescimento micelial.

Com os resultados obtidos, infere-se que a atividade antifúngica dos óleos essenciais está atrelada aos seus constituintes químicos; porém, nem sempre aqueles presentes em maiores concentrações são os responsáveis pela ação antifúngica, sendo possível substâncias minoritárias, ou até mesmo a capacidade de efeito sinérgico, interferir na ação final (BALDIM *et al.* 2018).

O mecanismo que explica a ação antifúngica dos constituintes dos óleos essenciais ainda não foi totalmente elucidado. Estudos descrevem que o caráter lipofílico dos compostos do óleo essencial e o seu baixo peso molecular permitem que eles atravessem a camada lipídica da membrana celular fúngica, causando danos à sua integridade (KISOVÁ *et al.* 2020, LYU *et al.* 2019). Além disso, os grupos funcionais presentes na estrutura das moléculas dos óleos essenciais, também, interferem no seu efeito antimicrobiano. Constituintes com grupos funcionais, como álcoois, fenóis, aldeídos, cetonas, éteres e ésteres, podem interagir com a membrana celular fúngica, induzindo danos ao microrganismo (YANG *et al.* 2023, KALEMBA e KUNICKA, 2003).

Dessa forma, a exposição do fungo aos compostos do óleo essencial pode causar alteração da permeabilidade da membrana, resultando em extravasamento de constituintes celulares vitais (Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^{+}), redução da biossíntese de ergosterol, alteração da fluidez e da morfologia, produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio e danos ao DNA. Todos

esses fatores individualmente ou em combinação podem atuar causando a morte celular fúngica (CHAUDHARI *et al.* 2019, BRANDÃO *et al.* 2020, KUMAR *et al.*, 2022, TIAN *et al.* 2012).

Atividade Antiocratoxigênica

Os resultados para a inibição da síntese de ocratoxina A de *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae* pelos óleos essenciais *R. officinalis* e *C. viminalis* e pelo monoterpeneo 1,8-cineol estão apresentados na Tabela 3. Foi observado um efeito significativo ($p < 0.05$) na inibição da síntese de OTA em todos os tratamentos em estudo, quando comparados com o controle fúngico (amostra contendo apenas o fungo em meio de cultura).

Tabela 3.

Relacionando-se os valores obtidos com o controle fúngico, observa-se para *A. ochraceus* uma inibição na produção de OTA variando de 24.69% a 53.66% para os três tratamentos. Com *A. carbonarius* houve uma variação de 32.51% a 91.00% na redução da síntese de OTA, ao passo que a quantidade de OTA inibida para *A. westerdijkiae* apresentou valores que variaram de 41.99% a 64.09%. As porcentagens de inibição dos três tratamentos diferiram entre si estatisticamente para todas as espécies fúngicas estudadas.

Comparando-se os resultados de inibição do crescimento micelial do fungo com a inibição da produção de OTA, pode-se observar que, para *A. ochraceus*, o óleo essencial de *C. viminalis* apresentou a maior porcentagem de inibição nos dois casos na concentração de 3000 $\mu\text{L L}^{-1}$, quando comparado aos outros tratamentos. O mesmo não aconteceu para *A. carbonarius*, visto que o monoterpeneo 1,8-cineol resultou no menor potencial antifúngico para a concentração de 3000 $\mu\text{L L}^{-1}$, ao passo que para a inibição de síntese de OTA, apresentou a maior porcentagem (91.00%), diferindo estatisticamente das amostras com óleo essencial.

Além disso, para *A. westerdijkiae*, o monoterpeneo 1,8-cineol teve o maior efeito de inibição do crescimento micelial, valor que não diferiu estatisticamente do óleo essencial de *C. viminalis* na concentração de 3000 $\mu\text{L L}^{-1}$; porém para a produção de OTA, este apresentou uma menor atividade antiocratoxigênica (41.99%) em relação aos outros dois tratamentos. Tais resultados mostram que impedir apenas o crescimento micelial do fungo não implica na inibição da produção de OTA. Além disso, apesar de os óleos essenciais em estudo apresentarem o mesmo composto majoritário (1,8-cineol), eles variaram no potencial antiocratoxigênico para o mesmo microrganismo. Isso pode ser explicado devido à presença de outros compostos que, provavelmente, interferem na atividade final do óleo essencial.

Pesquisas de El Khoury *et al.* (2016) ajudam a compreender essa diferença observada entre a inibição do crescimento micelial e a produção de OTA. Os autores estudaram o efeito de dez óleos essenciais na produção de OTA por *A. carbonarius*. Observaram que seis dos óleos essenciais testados, entre eles o óleo de *R. officinalis*, reduziram significativamente a produção de OTA, mas sem reduzir igualmente o crescimento fúngico. Tais resultados sugeriram que a redução de OTA estava associada à repressão de genes biossintéticos, como, por exemplo, os *acpks*, *acOTApks*, *acOTAnrps*, *laeA* e *veAgenes*, envolvidos na síntese de enzimas apropriadas da biossíntese de OTA. Da mesma forma, anteriormente, Murthy *et al.* (2009) também notaram que a redução no crescimento de *A. ochraceus* e a produção de OTA não foram lineares com o aumento da concentração do extrato etanólico de *Trachyspermum ammi*, quando utilizaram concentrações de 50 e 150 $\mu\text{L g}^{-1}$ do extrato. Eles concluíram que a inibição da produção de OTA foi maior do que a inibição do crescimento micelial do fungo.

Segundo Passone *et al.* (2012), Rucky *et al.* (2015) e Santos *et al.* (2010), a capacidade de produção de OTA depende de vários fatores físicos, químicos e biológicos, como, por exemplo: tempo de incubação; atividade de água; temperatura; pH; incidência de luz; linhagem fúngica; composição do substrato, entre outros. Passamani *et al.* (2014) relatam que as faixas de temperatura para produção de OTA são mais limitadas do que aquelas para o crescimento do fungo. Assim, pode-se inferir que as diferenças observadas entre o crescimento micelial do fungo e produção de OTA estejam relacionados com todos esses fatores mencionados.

Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A morfologia estrutural de *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae* tratados e não tratados com óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis* e com o monoterpeneo 1,8-cineol estão apresentados na Figura 2.

Os controles fúngico *A. ochraceus* (Fig. 2A), *A. carbonarius* (Fig. 2E) e *A. westerdijkiae* (Fig. 2I) apresentaram morfologia regular, com desenvolvimento de conídios e conidióforos. As hifas exibiram características uniforme, lisa, robusta, com diâmetro constante, linear e regular.

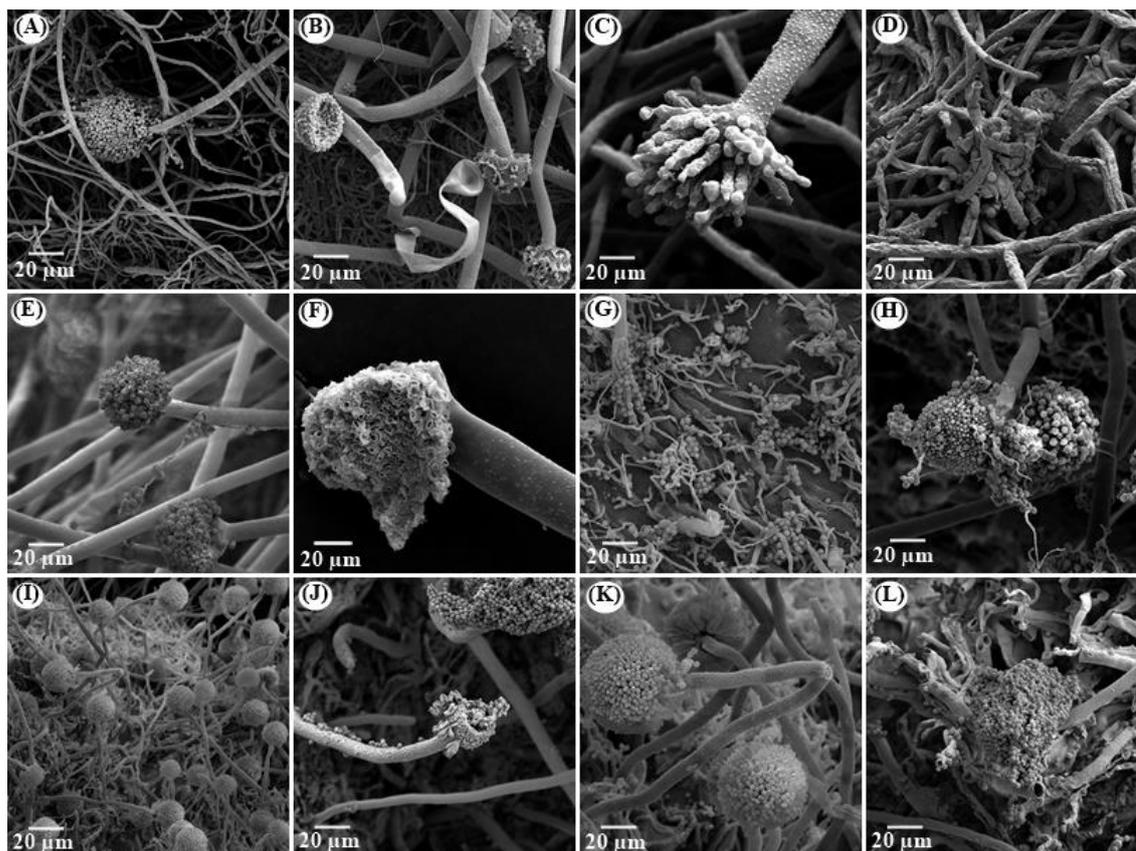


Figura 2. Micrografias eletrônicas de varredura de *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae* tratados com óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis* e o monoterpeneo 1,8-cineol: (A), (E) e (I) são controle de *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae*, respectivamente; (B), (C) e (D) *A. ochraceus* tratado com *R. officinalis*, *C. viminalis* e 1,8-cineol, respectivamente; (F), (G) e (H) *A. carbonarius* tratado com *R. officinalis*, *C. viminalis* e 1,8-cineol, respectivamente; (J), (K) e (L) *A. westerdijkiae* tratado com *R. officinalis*, *C. viminalis* e 1,8-cineol, respectivamente.

Várias alterações morfológicas foram observadas nas amostras tratadas com óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis* e o padrão 1,8-cineol, quando comparadas com os controles fúngicos. Pode-se notar que houve perda da integridade da cabeça do conídio, com rupturas (Fig. 2B, C, F, H, J e K) e não formação (Fig. 2D, G e L). As hifas também apresentam deformação na morfologia após os tratamentos, com diâmetros menores do que os controles, característica enrugada, achatada, colapsada e vazia (Fig. 2B, D, G, H e L).

Brandão *et al.* (2021) e Rezende *et al.* (2021) encontraram resultados semelhantes ao deste trabalho em que os tratamentos com óleo essencial ocasionaram em anomalias morfológicas nos fungos, com conseqüente diminuição na produção de esporos. Nota-se que essas alterações na estrutura do fungo podem estar relacionadas à característica lipofílica dos

constituintes do óleo essencial, que podem interagir com moléculas presentes na membrana celular. As proteínas presentes na membrana fúngica tem papel importante nas funções vitais do microrganismo (Li *et al.* 2021), e os óleos essenciais podem interagir com essas proteínas, bem como afetar a síntese de ergosterol, provocando alteração na permeabilidade da membrana, dificultando o crescimento fúngico, inibindo processos metabólicos e vazamento de materiais celulares (LIN *et al.* 2023, NERILO *et al.* 2016, BRANDÃO *et al.* 2021).

Material e Métodos

Obtenção do Material Vegetal e do Padrão Analítico

As folhas secas de *Rosmarinus officinalis* foram obtidas no comércio local de Lavras – MG/Brasil, e as folhas frescas de *Callistemon viminalis* foram coletadas no Câmpus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), situada na cidade de Lavras – MG/Brasil. O padrão analítico 1,8-cineol foi obtido comercialmente da Sigma-Aldrich, com pureza de 99%.

Extração do Óleo Essencial

A extração dos óleos essenciais foi realizada utilizando o método de hidrodestilação com aparelho de Clevenger modificado (ANVISA 2019). As folhas de *R. officinalis* e *C. viminalis* (250 g) foram colocadas em um balão de fundo redondo contendo água destilada e acoplado ao sistema Clevenger. O processo de hidrodestilação foi realizado por um período de duas horas. O hidrolato foi centrifugado por 15 minutos em centrífuga de bancada de cruzeta horizontal (Fanem Baby I Modelo 206-R) a 965,36 x g. Em seguida, o óleo essencial de cada planta foi coletado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro, acondicionado em um frasco de vidro e armazenado ao abrigo de luz e calor.

Determinação da Umidade e Rendimento dos Óleos Essenciais

A determinação da umidade do material vegetal foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Pimentel *et al.* (2006). Foram colocados cinco gramas do material vegetal a 80 mL de cicloexano em um balão de fundo redondo de 250 mL, posteriormente, acoplou-se o balão ao aparelho de Dean-Stark. O sistema foi submetido a aquecimento por duas horas, medindo-se o volume de água presente no material vegetal ao final. O teor de umidade foi realizado em triplicata. O rendimento foi calculado em porcentagem peso/peso (%p/p) e em base livre de umidade (BLU).

Identificação e Quantificação dos Constituintes do Óleo Essencial

A caracterização química dos constituintes dos óleos essenciais, qualitativamente e quantitativamente, foi realizada no Laboratório de Cromatografia no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp.

A identificação dos compostos dos óleos essenciais foi realizada utilizando-se um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (GC/MS) Thermo Scientific TRACE 1300 Series. As condições experimentais foram: uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase ligada DB5 (5% fenil; 95% dimetilpolisiloxano) (0,25 µm de espessura de filme); o gás de arraste foi o Hélio (He) com fluxo de 1.0 mL min⁻¹; a temperatura foi programada, iniciando-se em 60 °C, seguindo de um aumento de 3 °C min⁻¹ até atingir 250 °C; a temperatura do injetor foi de 250 °C e a temperatura do detector foi de 240 °C; o volume de amostra injetada foi de 0.5 µL, diluída em hexano; taxa de partição do volume injetado de 1:20 e pressão na coluna de 71,0 kPa. As condições do espectrômetro de massa foram as seguintes: detector de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos e fragmentos detectados na faixa de 45 a 500 Da.

O índice de retenção foi calculado utilizando a equação de Van den Dool e Kratz (1963) em relação à série homóloga de n-alcenos (nC8-nC18). Para identificar os constituintes, foi realizada uma comparação dos índices de retenção da literatura com aqueles obtidos no cromatograma (ADAMS 2007). Também foram utilizadas duas bibliotecas do equipamento NIST107 e NIST21, que permitem a comparação dos dados dos espectros com aqueles existentes nas bibliotecas.

A análise quantitativa foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chamas (FID), Thermo Scientific TRACE 1300 Series. As condições experimentais foram as mesmas utilizadas para GC/MS e a quantificação de cada constituinte foi obtida por meio da normalização de áreas (%).

Microrganismos e Preparo da Solução de Esporos

As espécies de fungos filamentosos: *Aspergillus ochraceus* (CCDCA 10490), *Aspergillus carbonarius* (CCDCA 10447) e *Aspergillus westerdijkiae* (CCDCA 11469) foram estudadas. Essas foram obtidas da Coleção de Culturas de Microrganismos do Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA. As espécies de fungos foram cultivadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio Malt Extract Agar (MEA) a 25 °C durante sete dias, em uma incubadora BOD. Após esse período, preparou-se a suspensão de esporos dos fungos em água destilada a 1% de Tween 80

e a contagem do número de esporos final foi realizada em câmara de Neubauer (10^6 esporos mL^{-1}).

Efeito do Óleo Essencial sobre o Crescimento Micelial dos Fungos

A porcentagem de inibição micelial dos fungos foi avaliada pelo método de fumigação *in vitro* descrito por Guimarães *et al.* (2011). O plaqueamento foi realizado utilizando 10 μL da suspensão de esporos no centro da placa contendo 20 mL do meio Yeast Extract Sucrose Agar (YES) para *A. ochraceus*, e Czapeck Yeast Agar (CYA) para *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae*. Discos de papel-filtro de 4 cm diâmetro estéreis foram fixados na tampa da placa e adicionaram-se 250 μL , com auxílio de uma pipeta automática, dos óleos essenciais e do monoterpeneo 1,8-cineol diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), nas concentrações de 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000 e 3000 $\mu\text{L L}^{-1}$. Como padrão de comparação, 10 μL da suspensão de esporos foram adicionados à placa contendo apenas o meio de cultura (controle fúngico).

As placas foram lacradas e incubadas em BOD, a 25 °C, por um período de 10 dias. Após, foram realizadas medidas do diâmetro de crescimento micelial das colônias. Essas análises foram realizadas em triplicata e o cálculo da porcentagem de inibição no crescimento micelial do fungo foi realizado de acordo com a equação descrita por Brandão *et al.* (2020).

Efeito do Óleo Essencial na Síntese de OTA

A atividade ocratoxigênica dos óleos essenciais e do padrão 1,8-cineol foi realizada pelo método descrito por Wang *et al.* (2012), avaliando a inibição da produção de OTA pelos fungos *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae* em meio de cultura.

A extração de OTA foi realizada no 10º dia de incubação dos esporos fúngicos, seguindo a metodologia descrita por Passamani *et al.* (2014). Inicialmente, três plugs da colônia foram removidos do centro, meio e da borda das placas. Os plugs foram pesados em uma balança analítica e depositados em tubo de ensaio envolvido por papel alumínio. Depois adicionou-se 1 mL de metanol grau HPLC em cada tubo de ensaio, agitando-se vigorosamente por cinco segundos e mantendo a 25 °C por 60 minutos. Os extratos foram filtrados por membranas de politetrafluoretileno (PTFE) (0.22 μm ; Millipore).

A quantificação de OTA foi determinada por meio do método descrito por Passamani *et al.* (2014), utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimatzu, modelo SPD-M20A, Kyoto, Japão), equipado com duas bombas de alta pressão, um desgaseificador (DGU 20A3), interface (CBM-20A), injetor automático (SIL-10AF) e detector de fluorescência (RF-10 AXL).

A coluna utilizada foi a Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 250 mm, 5 μm) conectada a uma pré-coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 12.5 mm, 5 μm). Os comprimentos de onda utilizados foram: excitação a 332 nm e emissão a 476 nm. O fluxo foi de 0.8 mL min^{-1} e o volume injetado das amostras foi de 20 μL . A eluição foi realizada em sistema isocrático de 35:35:29:1 (metanol: acetonitrila: água: ácido acético). A quantificação de OTA foi realizada por meio de padronização externa, com a construção de uma curva analítica obtida por regressão linear, correlacionando a área do pico do cromatograma e a concentração do padrão. O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0.9999, o limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram de 0.0004 e 0.0016 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Para calcular a porcentagem de inibição da produção de OTA pelas amostras, foi utilizada a seguinte equação: $I = [(O_c - O_t / O_c) \times 100]$, em que O_c corresponde à ocratoxina produzida pelo controle e O_t , à ocratoxina produzida após tratamento com óleo essencial (BRANDÃO *et al.* 2020)

Avaliação Morfológica por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A análise de alterações morfológicas dos fungos pela influência dos óleos essenciais de *R. officinalis*, *C. viminalis* e do padrão 1,8-cineol foi avaliada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), usando o Microscópio Eletrônico Leo EVO 040 para obtenção das eletromicrografias.

As amostras foram preparadas conforme o ensaio de fumigação, descrito anteriormente, para avaliar o crescimento micelial, no décimo dia de incubação. A concentração utilizada foi a última que teve crescimento do micélio, ou seja, a concentração de 3000 $\mu\text{L L}^{-1}$ para todos os tratamentos. Três “plugs” foram retirados da colônia e transferidos para microtubos de centrífuga, tipo eppendorfs, contendo a solução fixadora de Karnovsky modificada (2.5% de glutaraldeído, 2% de formaldeído, tampão cocodilato 0.05 M, pH 7.2 e tampão CaCl_2 0.001 M), por um período mínimo de 24 horas. As amostras foram lavadas três vezes por 10 minutos com tampão cocodalito de sódio 0.05 M e pH 7.2, posteriormente, foram desidratadas usando uma série de concentrações crescentes de acetona (25, 50, 75, 90 e 100%), sendo a concentração de 100% utilizada duas vezes por 10 minutos e secas em um aparelho de ponto crítico (Bal-tec CPD 030). Montaram-se as amostras secas em stubs com fita dupla face e pulverizou-as com ouro (Bal-tec SCD 050) (DE OLIVEIRA *et al.* 2017).

Análise Estatística

Os resultados dos óleos essenciais e do padrão, sobre a porcentagem de inibição do crescimento micelial e na síntese de ocratoxina A, foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas por meio do Teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade para cada tratamento com 3 repetições. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) e o programa estatístico foi o RStudio, versão 7872775e.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG – 02390/18); pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – 311183/2022-0) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código financeiro 001.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento pelas bolsas e apoio financeiro, bem como ao Centro de Prospecção Química de Análises da Universidade Federal de Lavras (CAPQ-UFLA), ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME-UFLA) e ao Laboratório de Cromatografia no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não ter conflito de interesses.

Referências

Adams RP. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. 4. Ed., 2007.

Al Zuhairi JJMJ, Kashi FJ, Rahimi-Moghaddam A, Yazdani M. Antioxidant, cytotoxic and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil against bacteria isolated from urinary tract infection. *Eur. J. Integr. Med.* 2020; **38**: 101192.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). *Formulário nacional da Farmacopeia brasileira*, 6ª edição, 2019.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, IDAOMAR M. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. l Toxicol.* 2008; **46**: 446–475.

Baldirim JL, Silveira JGF, Almeida AP *et al.* The synergistic effects of volatile constituents of *Ocimum basilicum* against foodborne pathogens. *Ind. Crops Prod.* 2018; **112**: 821-829

- Brandão RM, Ferreira VRF, Batista LB *et al.* Antifungal activity and the effect of the essential oil of *Lippia origanoides* Kunth on *Aspergillus* mycotoxins production. *Aust. J. Crop Sci.* 2021; **15**: 1005 – 1012.
- Brandão RM, Ferreira VRF, Batista LB *et al.* Antifungal and antimycotoxigenic effect of the essential oil of *Eremanthus erythropappus* on three different *Aspergillus* species. *Flavour and Fragrance Journal*, 2020; **35**: 524-533.
- Camargo KC, Batista LR, Alves E *et al.* Antibacterial action of the essential oil from *Cantinoa carpinifolia* benth. Against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains. *Flavour and Fragrance Journal* 2020; **35**: 99-106.
- Chaudhari AK, Dwivedy AK, Singh VK *et al.* Essential oils and their bioactive compounds as green preservatives against fungal and mycotoxin contamination of food commodities with special reference to their nanoencapsulation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2019; **26**: 25414-25431.
- De Oliveira MMM, Brugnera DF, Alves E *et al.* Morphological alterations in sessile cells of *Listeria monocytogenes* after treatment with *Cymbopogon* sp. essential oils. *Magistra* 2017; **26**: 385-392.
- El Khoury R, Atoui A, Verheecke C *et al.* Essential oils modulate gene expression and ochratoxin A production in *Aspergillus carbonarius*. *Toxins*, 2016; **8**: 242.
- FAO; WHO. *Codex Alimentarius: Understanding Codex*. 5^o edition, 2018.
- Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* 2007; **30**: 374-381.
- Guimarães LGDL, Cardoso MG, De Sousa PE *et al.* Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim limão e do citral. *Ver. Ciên. Agron.* 2011; **42**: 464–472.
- Hua H, Xing F, Selvarai JN *et al.* Inhibitory Effect of Essential Oils on *Aspergillus ochraceus* Growth and Ochratoxin A Production. *PLOS ONE* 2014; **9**: e108285.
- IARC - International Agency for Research on Cancer. Chemical agents and related occupations. *IARC Monographs on the evaluation carcinogenic risks to humans* 2012; **100F**: 225-244.
- Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 2003; **10**: 813-829.
- Kisová Z, Soltýsová A, Buckoyá M *et al.* Studying the gene expression of *Penicillium rubens* under the effect of eight essential oils. *Antibiotics* 2020; **9**: 343.
- Kumar OS, Nattudurai G, Islam VIH, Ignacimuthu S. The effects of some essential oils on *Alternaria alternata*, a post-harvest phyto-pathogenic fungus in wheat by disrupting ergosterol biosynthesis. *Phytoparasitica* 2022; **50**: 513–525.
- Li F, Egea PF, Vecchio AJ *et al.* Highlighting membrane protein structure and function: A celebration of the Protein Data Bank. *J. Biol. Chem.* 2021; **296**: 100557.
- Lin L, Chen S, Xia W *et al.* A new strategy: Inhibitory effect and mechanism of *Cymbopogon martinii* essential oil on *Aspergillus flavus*. *Food Bioscience* 2023; **51**: 102315.
- Lunguinho AS, Cardoso MG, Ferreira VRF *et al.* Acaricidal and repellent activity of the essential oils of *Backhousia citriodora*, *Callistemon viminalis* and *Cinnamodendron dinisii* against *Rhipicephalus* spp. *Veterinary Parasitology* 2021; **300**: 109594.

- Lyu X, Lee J, Chen WN. Potential natural food preservatives and their sustainable production in yeast: terpenoids and polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 2019; **67**: 4397-4417.
- Moon YS, Choi W, Park E *et al.* Antifungal and antiaflatoxicogenic methylenedioxy-containing compounds and piperine-like synthetic compounds. *Toxins* 2016; **8**: 2-10.
- Moussii IM, Nayme K, Timinouni M *et al.* Synergistic antibacterial effects of Moroccan *Artemisia herba alba*, *Lavandula angustifolia* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Synergy* 2020; **10**: 100057.
- Murthy PS, Borse BB, Khanum H *et al.* Inhibitory effects of ajowan (*Trachyspermum ammi*) ethanolic extract on *A. ochraceus* growth and ochratoxin production. *Turk. J Biol.* 2009; **33**: 211-217.
- Nerilo SB, Rocha GHO, Tomoike C *et al.* Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production by *Zingiber officinale* essential oil in *Aspergillus flavus*. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2016; **51**: 286-292.
- Passamani FRF, Hernandez T, Lopes NA *et al.* Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes. *Journal of Food Protection* 2014; **77**: 1947-1952.
- Passone MA, Girardi NS, Etcheverry M. Evaluation of the control ability of five essential oils against *Aspergillus* section *Nigri* growth and ochratoxin A accumulation in peanut meal extract agar conditioned at different water activities levels. *Int. J. Food Microbiol.* 2012; **159**: 198–206.
- Pimentel FA, Cardoso MG, Salgado APSP *et al.* A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. *Química Nova* 2006; **29**: 373–375.
- Rezende DACS, Souza RV, Magalhães ML *et al.* Characterization of the biological potential of the essential oils from five species of medicinal plants. *American Journal of Plant Sciences* 2017; **8**: 154-170.
- Rezende DACS, Souza RV, Magalhães ML *et al.* Effect of the essential oils of *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H. and *Cymbopogon flexuosus* S. on mycotoxin producing *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus* antifungal properties of essential oils. *FEMS Microbiology Letters* 2021; **368**: fnab137.
- Ruyck KD, De Boevre M, Huybrechts I, De Saeger S *et al.* Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. *Mutation Research* 2015; **766**: 32-41.
- Sales TA, Cardoso MG, Guimarães LGL *et al.* Essential oils from the leaves and flowers of *Callistemon viminalis*: chemical characterization and evaluation of the insecticide and antifungal activities. *American Journal of Plant Sciences* 2017; **8**: 2516-2529.
- Santos L, Kasper R, Gil-Serna J *et al.* Effect of *Capsicum* carotenoids on growth and ochratoxin A production by chilli and paprika *Aspergillus* spp. Isolates. *Int. J. Food Microbiol.* 2010; **142**: 354-359.
- Silva AS, Pereira RGFA, Lira NA *et al.* Fungi associated to beans infested with coffee berry borer and the risk of ochratoxin A. *Food Control* 2020; **113**: 107204.
- Tian J, Ban X, Zeng H *et al.* The mechanism of antifungal action of essential oil from Dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. *PLOS ONE* 2012; **7**: e30147.

Van Den Dool H, Kratz PD. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A* 1963; **11**: 463-471.

Wang H, Liu Y, Wei S, Yan Z *et al.* Comparative seasonal variation and chemical composition of essential oils from the leaves and stems of *Schefflera heptaphylla* using microwave-assisted and conventional hydrodistillation. *Ind. Crops Prod.* 2012; **36**: 229-237.

Yang S, He M, Li D *et al.* Antifungal activity of 40 plant essential oil components against *Diaporthe fusicola* from postharvest kiwifruits and their possible action mode. *Ind. Crops Prod.* 2023; **194**: 116102.

Tabelas

Tabela 1. Teor de umidade e rendimento do óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis*

Planta	Umidade (%)	Rendimento do óleo essencial (% p/p BLU)
<i>R. officinalis</i>	7.35	0.85
<i>C. viminalis</i>	39.16	1.02

Legenda: BLU – Base Livre de Umidade

Tabela 2. Composição química do óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis*

IR _{tab.}	IR _{calc.}	Composto	Área do pico (%)	
			<i>R. officinalis</i>	<i>C. viminalis</i>
924	923	α -tujeno	-	0.08
932	929	α-pineno	8.24	15.32
946	950	Canfeno	2.80	-
974	979	β -pineno	0.41	0.90
998	998	Mirceno	0.65	0.28
1002	1005	α -felandreno	-	0.58
1007	1007	Butirato de isoamila	-	2.25
1014	1016	α -terpineno	0.27	-
1020	1019	p-cimeno	2.44	-
1024	1021	Limoneno	2.18	8.60
1025	1023	β -felandreno	0.11	-
1026	1027	1,8-cineol	49.24	56.70
1095	1101	Linalol	0.73	0.37
1141	1140	Cânfora	17.28	-
1165	1163	Borneol	5.33	-
1174	1171	Terpinen-4-ol	-	1.98
1186	1188	α-terpineol	3.44	6.50
1298	1296	Carvacrol	0.34	-
1408	1402	β -cariofileno	0.44	-
Composição				
Hidrocarbonetos Monoterpênicos			17.10	25.76
Monoterpenos oxigenados			76.36	67.80
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos			0.44	-
Total identificado (%)			93.90	93.56

Tabela 3. Inibição na síntese de ocratoxina A dos fungos *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae* tratados com óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis* e 1,8-cineol

Porcentagem de inibição da produção de Ocratoxina A (%)			
Tratamento	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. westerdijkiae</i>
<i>R. officinalis</i>	51.76 ±0.14 ^b	32.51 ±0.74 ^c	52.83 ±1.52 ^b
<i>C. viminalis</i>	53.66 ±0.10 ^a	79.65 ±0.06 ^b	64.09 ±0.18 ^a
1,8-cineol	24.69 ±0.01 ^c	91.00 ±0.02 ^a	41.99 ±1.27 ^c

Legenda: Letras minúsculas idênticas na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ARTIGO 2- Atividade antifúngica e antimicotoxigênica de nanofibras de poli(ácido láctico) incorporadas com óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* e *Callistemon viminalis* sobre fungos do gênero *Aspergillus*

Artigo escrito de acordo com as normas NBR 6022 (ABNT 2018)

RESUMO

Os grãos de café podem ser contaminados por fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus*, provocando alterações indesejáveis, perda econômica e produção de micotoxinas prejudiciais à saúde humana e animal. Objetivou-se neste trabalho extrair e caracterizar o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* e *Callistemon viminalis*, produzir e caracterizar nanofibras de poli (ácido láctico) contendo esses óleos essenciais e avaliar *in vitro* a atividade antifúngica e antiocrotaxigênica das nanofibras bioativas. Os óleos essenciais foram extraídos pela técnica de hidrodestilação e caracterizados por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC/MS) e Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chamas (GC/FID). As nanofibras foram produzidas pela técnica de fiação por sopro de solução (SBS) e caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia no Infravermelho (FTIR) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). O efeito das nanofibras incorporadas com óleo essencial no crescimento fúngico e na produção de ocratoxina A foram avaliados por meio do teste de fumigação, e a análise morfológica dos microrganismos, por MEV. Em ambos os óleos essenciais, o constituinte majoritário foi o 1,8-cineol. As eletromicrografias mostraram aumento no diâmetro médio das nanofibras encapsuladas com óleo essencial. Foi observada para as espécies *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus westerdijkiae* uma atividade antifúngica significativa. A síntese de OTA foi inibida pela presença das nanofibras encapsuladas com óleo essencial sobre os quatro fungos em estudo. Por meio desses resultados infere-se que as nanofibras incorporadas com óleo essencial podem ser uma alternativa para controle de fungos micotoxigênicos.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis*. *Callistemon viminalis*. *Aspergillus* sp. Ocratoxina A. Nanotecnologia. Nanofibras.

1. INTRODUÇÃO

O café, uma das principais commodities agrícolas do Brasil, apresenta grande valor comercial, sendo cultivado em vários estados brasileiros. As condições climáticas, geográficas e os processos envolvidos no seu cultivo podem influenciar na qualidade dos grãos e, conseqüentemente, da bebida, tornando-os susceptíveis à contaminação fúngica. Os principais fungos que podem contaminar o grão de café são do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, causando alterações indesejáveis nos valores nutricionais e nas características organolépticas. Além disso, esses microrganismos são capazes de sintetizar micotoxinas, metabólitos secundários considerados prejudiciais à saúde humana e animal, devido ao seu potencial carcinogênico (TANIWAKI; PITT; MAGAN, 2018).

A ocratoxina A (OTA) é uma das principais micotoxinas encontradas no grão de café, sendo as espécies *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* grandes produtores de OTA (PASSAMANI *et al.*, 2014). A exposição humana por ingestão de OTA pode causar efeitos nefrotóxicos, imunossupressores e teratogênicos, sendo ainda considerado pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Cancer – IARC) como possível carcinogênico humano do Grupo 2B (BOONME *et al.*, 2020; IARC, 2012).

Os óleos essenciais têm sido alvo de pesquisas como alternativa aos fungicidas sintéticos, pelo fato de os seus constituintes químicos terem ação comprovada e por serem considerados seguros para o meio ambiente e para a saúde humana e animal. Os compostos químicos terpenos e fenilpropanoides, que compõem o óleo essencial, são, em sua maioria, classificados como “Geralmente reconhecidos como seguros” (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA) e pela Environment Protection Agency (EPA) (BURT, 2004; AN *et al.*, 2020).

O óleo essencial extraído das espécies de *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) e *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) são importantes fontes de compostos químicos. Os principais constituintes encontrados no óleo essencial das duas plantas são 1,8-cineol, cânfora, α -pineno, borneol e limoneno (CAETANO *et al.*, 2022; LUNGUINHO *et al.*, 2021). Vários estudos relataram o potencial biológico dessas espécies, inclusive no controle fúngico, sendo, assim, de grande interesse das indústrias alimentícia, agrícola e farmacêutica (MEKONNEN *et al.*, 2016; SALES *et al.*, 2017).

Apesar da comprovada ação antimicrobiana dos óleos essenciais, existem algumas limitações no seu uso direto, como a alta volatilidade dos seus componentes, baixa solubilidade em água e capacidade de oxidação (ALBUQUERQUE *et al.*, 2022). Assim, o encapsulamento

dos constituintes químicos em matrizes poliméricas nanoestruturadas permite prolongar a eficiência dos óleos essenciais, bem como melhorar sua estabilidade química. As nanofibras são vantajosas por apresentarem estruturas porosas, grande área superficial e capacidade de liberação controlada de princípios ativos, permitindo interação com moléculas bioativas (OZCAN *et al.*, 2023; MORIE *et al.*, 2014).

A técnica de fiação por sopro em solução (SBS) é favorável para a produção das nanofibras, pois é um método simples que apresenta alta taxa de fiação, baixo custo e possibilidade de aplicação em diferentes superfícies (MEDEIROS *et al.*, 2009; BONAN *et al.*, 2017). No presente trabalho objetivou-se extrair e caracterizar quimicamente o óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis*; produzir e caracterizar nanofibras de poli (ácido láctico) (PLA) carregados com esses óleos essenciais e avaliar o seu potencial antifúngico e antiocrotogênico diante dos fungos *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Extração e Caracterização Química dos Óleos Essenciais

As folhas secas de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) foram obtidas comercialmente na cidade de Lavras, Minas Gerais e as folhas frescas de *Callistemon viminalis* (escova-de-garrafa) foram coletadas no Câmpus da Universidade Federal de Lavras (UFLA) (21°13' de latitude sul e 44°58' longitude oeste). O óleo essencial foi extraído pelo processo de hidrodestilação durante 2 horas, usando um aparelho Clevenger modificado, seguindo a metodologia da Anvisa (2019).

A caracterização química dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Cromatografia no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, por meio de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (GC/MS, Thermo Scientific TRACE 1300 Series). As condições experimentais foram: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase ligada DB5 (5% fenil; 95% dimetilpolisiloxano) (0,25 µm de espessura de filme); o gás de arraste foi o Hélio (He) com fluxo de 1,0 mL min⁻¹; a temperatura foi programada, iniciando-se em 60 °C, seguindo de um aumento de 3 °C min⁻¹ até atingir 250 °C; a temperatura do injetor foi de 250 °C e a temperatura do detector foi de 240 °C; o volume de amostra injetada foi de 0,5 µL, diluída em hexano; taxa de partição do volume injetado de 1:20 e pressão na coluna de 71,0 kPa. As condições do espectrômetro de massa foram as seguintes: detector de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos e fragmentos detectados na faixa de 45 a 500 Da.

A identificação dos constituintes foi realizada por comparação dos índices de retenção da literatura com aqueles obtidos no cromatograma (ADAMS, 2007). Os espectros de massa

dos constituintes do óleo essencial foram comparados com os da biblioteca NIST107, NIST21 e FFNSC1.2. A equação de Van den Dool e Kratz (1963) foi utilizada para calcular o índice de retenção em relação à série homóloga de n-alcenos (nC8-nC18).

A análise quantitativa foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a um detector de ionização de chamas (FID) (Thermo Scientific TRACE 1300 Series). As condições experimentais foram as mesmas utilizadas para GC/MS e a quantificação de cada constituinte foi obtida por meio da normalização de áreas (%).

2.2. Produção das Nanofibras por SBS

A solução polimérica de PLA foi preparada seguindo a metodologia descrita por Brandão *et al.* (2023), em que o PLA foi dissolvido em clorofórmio a uma concentração de 12% (p/v) à temperatura ambiente. Posteriormente, os óleos essenciais foram adicionados a 20% (v/p) em relação ao peso total do polímero.

O sistema de fiação por sopro em solução (SBS) foi utilizado para produzir as nanofibras de PLA de acordo com os métodos descritos por Bonan *et al.* (2017) e Nepomuceno *et al.* (2017), com algumas modificações. As condições experimentais foram as seguintes: temperatura de 30 – 32 °C, umidade relativa de 40 – 46 %, uma agulha conectada a um bocal concêntrico com uma ponta de 2 mm, bomba de injetora de solução polimérica (NE-300; New Era Pump Systems, Syringe Pumo, New York, EUA) com uma seringa de vidro (FLURAN F-5500- A; Ismatec, Wertheim, Alemanha) e uma fonte de ar comprimido a 140 kPa (Chiaperini MC 12 BPV 150 L 2 HP, Brasil). Foi utilizada uma vazão de 6 mL h⁻¹ e uma distância de trabalho entre a ponta da agulha e o coletor rotativo de 30 cm. O controle negativo foi preparado com nanofibras sem adição do óleo essencial.

2.3. Caracterização das Nanofibras

Todas as amostras de nanofibras foram avaliadas, quanto à sua morfologia e diâmetro, por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV, JSM-6510, Jeol), seguindo a metodologia descrita por Brandão *et al.* (2022a). Inicialmente, as amostras foram cortadas e coladas em stubs de metal usando fita adesiva de carbono dupla face e, posteriormente, revestidas com ouro (Baltec SCD 050, Balzers AG, Liechtenstein). O diâmetro médio e o desvio padrão das amostras (100 nanofibras) foram determinadas por software de imagem Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

Os espectros no infravermelho das nanofibras foram obtidos a partir de um espectrômetro de infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR, Vertex 70, Bruker, Germany). A técnica de refletância atenuada (ATR) foi utilizada para analisar as

amostras de nanofibras e dos óleos essenciais. Para cada ensaio, foram realizadas 32 varreduras com faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} em uma resolução de 4 cm^{-1} (MIRANDA *et al.*, 2019).

O estudo do efeito dos óleos essenciais nas propriedades térmicas das nanofibras de PLA foi realizado por um calorímetro exploratório diferencial (DSC-60A, Shimadzu, Japão), seguindo a metodologia descrita por Miranda *et al.* (2019). Todas as amostras (5,00 mg) foram colocadas em cadinhos de alumínio selados e submetidas a dois ciclos de aquecimento, sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1} . A taxa de aquecimento foi de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até alcançar 180 $^{\circ}\text{C}$, partindo da temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Os valores de transição vítrea (T_g), temperatura de cristalização (T_c), temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade ($X_c\%$) foram determinados.

2.4. Efeito Antifúngico

Os fungos filamentosos *Aspergillus carbonarius* (CCDCA10447), *Aspergillus niger* (CCDCA10443), *Aspergillus ochraceus* (CCDCA10490) e *Aspergillus westerdijkiae* (CCDCA11469) foram obtidos da Coleção de Cultura de Microrganismos do Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos da UFLA. O isolado de cada fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura Malt Extract Agar (MEA) a 25 $^{\circ}\text{C}$ por 7 dias em uma incubadora BOD. Após esse período, preparou-se a suspensão de esporos dos fungos em água destilada estéril com Tween 80 a 1%. A contagem do número de esporos final foi realizada em câmara de Neubauer (10^6 esporos mL^{-1}).

A atividade antifúngica das nanofibras incorporadas com óleo essencial foi determinada pelo método de fumigação *in vitro*, de acordo com a metodologia descrita por Guimarães *et al.* (2011) com modificações. Inicialmente, adicionaram-se nas placas de Petri 20 mL do meio de cultura Czapeck Yeast Agar (CYA) para *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. westerdijkiae* e Yeast Extract Sucrose Agar (YES) para *A. ochraceus*. Posteriormente, as nanofibras foram cortadas com 4 cm de diâmetro, fixadas na tampa da placa de Petri, e 10 μL da suspensão de esporos foram adicionados no centro da placa contendo o meio solidificado. Como padrão de comparação, 10 μL da suspensão de esporos foram adicionados à placa contendo apenas o meio de cultura (controle fúngico).

As placas foram vedadas e colocadas em BOD, a 25 $^{\circ}\text{C}$, por um período de 10 dias. Em seguida, foram realizadas medidas do diâmetro de crescimento micelial das colônias. Essas análises foram realizadas em triplicata e o cálculo da porcentagem de inibição no crescimento micelial do fungo foi realizado de acordo com a equação: $I = [(dc-dt)/dc] \times 100$, em que dc (cm)

é o diâmetro do crescimento micelial do controle fúngico e dt (cm) é o diâmetro do crescimento micelial de cada tratamento (BRANDÃO *et al.*, 2021).

2.5. Efeito Antimicotoxigênico

A atividade ocratoxigênica das mantas de nanofibras incorporadas com óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis* foi realizada pelo método descrito por Wang *et al.* (2012), avaliando a inibição da produção de OTA pelos fungos *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus*, e *A. westerdijkiae* em meio de cultura.

As amostras foram preparadas a partir das placas de Petri utilizadas na análise do crescimento micelial. A extração de OTA foi realizada no décimo dia de incubação das placas, em BOD a 25 °C, seguindo a metodologia descrita por Passamani *et al.* (2014). Foram removidos e pesados, do centro, meio e borda da placa, três plugs da colônia. Posteriormente, os plugs foram depositados em tubos de ensaio adicionando-se 1 mL de metanol grau HPLC em cada tudo, agitando vigorosamente por 5 segundos. As amostras foram mantidas em repouso a 25 °C por 60 minutos. Posteriormente, os extratos foram filtrados por membranas de politetrafluoretileno (PTFE) (0,22 µm; Millipore).

A quantificação de OTA foi determinada por meio do método descrito por Passamani *et al.* (2014) utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimatzu, modelo SPD-M20A, Kyoto, Japão), equipado com duas bombas de alta pressão, um desgaseificador (DGU 20A3), interface (CBM-20A), injetor automático (SIL-10AF) e detector de fluorescência (RF-10 AXL). As separações foram realizadas em uma coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) conectada a uma pré-coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 12,5 mm, 5 µm). A OTA foi excitada em comprimento de onda de 332 nm e emitida a 476 nm. O fluxo foi de 0,8 mL min⁻¹ e o volume injetado das amostras foi de 20 µL. A eluição foi realizada em sistema isocrático de 35:35:29:1 (metanol: acetonitrila: água: ácido acético).

A quantificação de OTA foi realizada por meio de uma curva analítica, sendo a mesma obtida por Brandão *et al.* (2021). O tempo de retenção da OTA foi de 10±0,5 minutos. Para calcular a porcentagem de inibição da produção de OTA pelas amostras, foi utilizada a equação descrita por Brandão *et al.* (2021), sendo todas as amostras foram analisadas em triplicata.

2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliar as alterações morfológicas dos fungos após tratamento com as nanofibras de PLA incorporadas com óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis*. As amostras utilizadas foram preparadas conforme o ensaio de fumigação, descrito anteriormente, para avaliar o crescimento micelial. As

eletromicrografias foram obtidas e avaliadas por meio de um microscópio eletrônico Leo EVO 040.

Foram retirados “plugs” da colônia e transferidos para microtubos de centrífuga, tipo eppendorfs, contendo a solução fixadora de Karnovsky modificada (2,5% de glutaraldeído, 2% de formaldeído, tampão cocodilato 0,05 M, pH 7,2 e tampão CaCl_2 0,001 M), por um período mínimo de 24 horas. As amostras foram lavadas três vezes por 10 minutos com tampão cocodalito de sódio 0,05 M e pH 7,2; posteriormente, foram desidratadas usando uma série de concentrações crescentes de acetona (25, 50, 75, 90 e 100%), sendo a concentração de 100% utilizada duas vezes por 10 minutos e secas em um aparelho de ponto crítico (Bal-tec CPD 030). Montaram-se as amostras secas em stubs com fita dupla face e pulverizou-as com ouro (Bal-tec SCD 050), de acordo com a metodologia descrita por Oliveira *et al.* (2017).

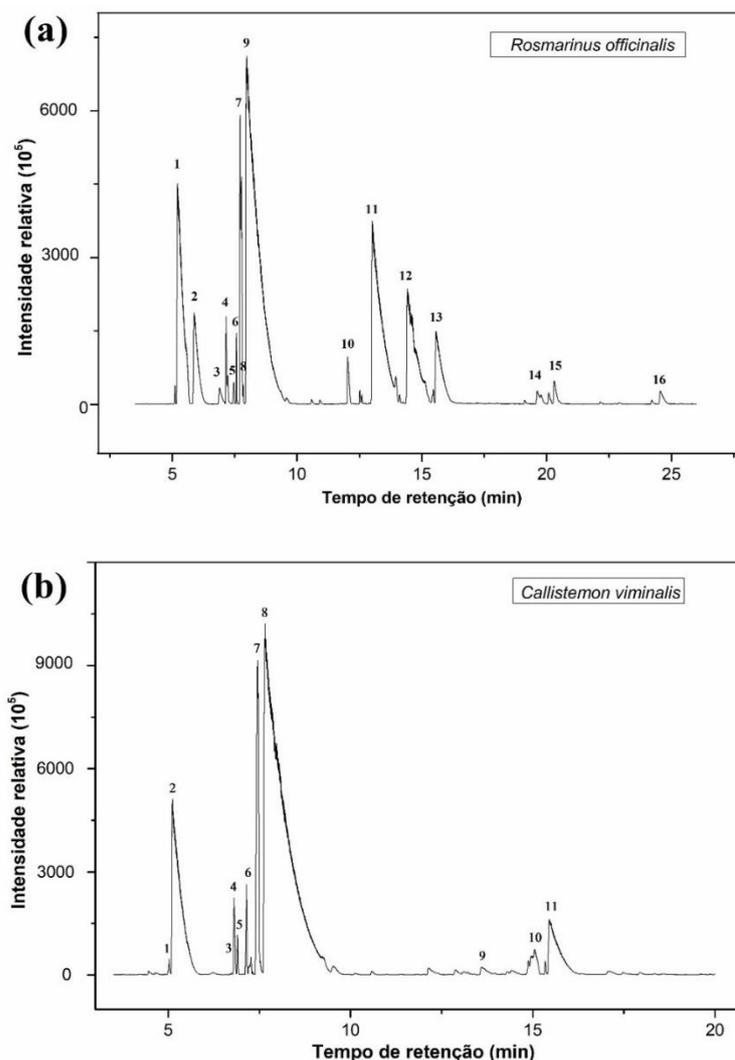
2.7. Análise Estatística

Os dados obtidos foram tratados por delineamento inteiramente casualizado (DIC) por meio do programa estatístico RStudio, versão 7872775e, em que os valores foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas por meio do Teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade para cada tratamento em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização química dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de *R. officinalis* e *C. viminalis* apresentaram um rendimento de 0,85% e 1,02%, respectivamente, em base livre de umidade. Os cromatogramas dos óleos essenciais estão representados na Figura 1. O óleo essencial de *R. officinalis* apresentou como constituintes majoritários o 1,8-cineol (49,24%), cânfora (17,28%), α -pineno (8,24 %) e borneol (5,33 %), ao passo que os majoritários do óleo essencial de *C. viminalis* foram 1,8-cineol (56,70 %), α -pineno (15,32 %), limoneno (8,60 %) e α -terpineol (6,50 %).

Figura 1 – Cromatogramas do óleo essencial de *R. officinalis* (a) e *C. viminalis* (b)

Legenda: (a): 1- α -pineno; 2- canfeno; 3- β -pineno; 4- mirceno; 5- α -terpineno; 6- p-cimeno; 7- limoneno; 8- β -felandreno; 9- 1,8-cineol; 10- linalol; 11- cânfora; 12- borneol; 13- α -terpineol; 14- acetato bornil; 15- carvacrol; 16- β -cariofileno. (b): 1- α -tujeno; 2- α -pineno; 3- β -pineno; 4- mirceno; 5- α -felandreno; 6- butirato de isoamila; 7- limoneno; 8- 1,8-cineol; 9- linalol; 10- terpinen-4-ol; 11- α -terpineol.

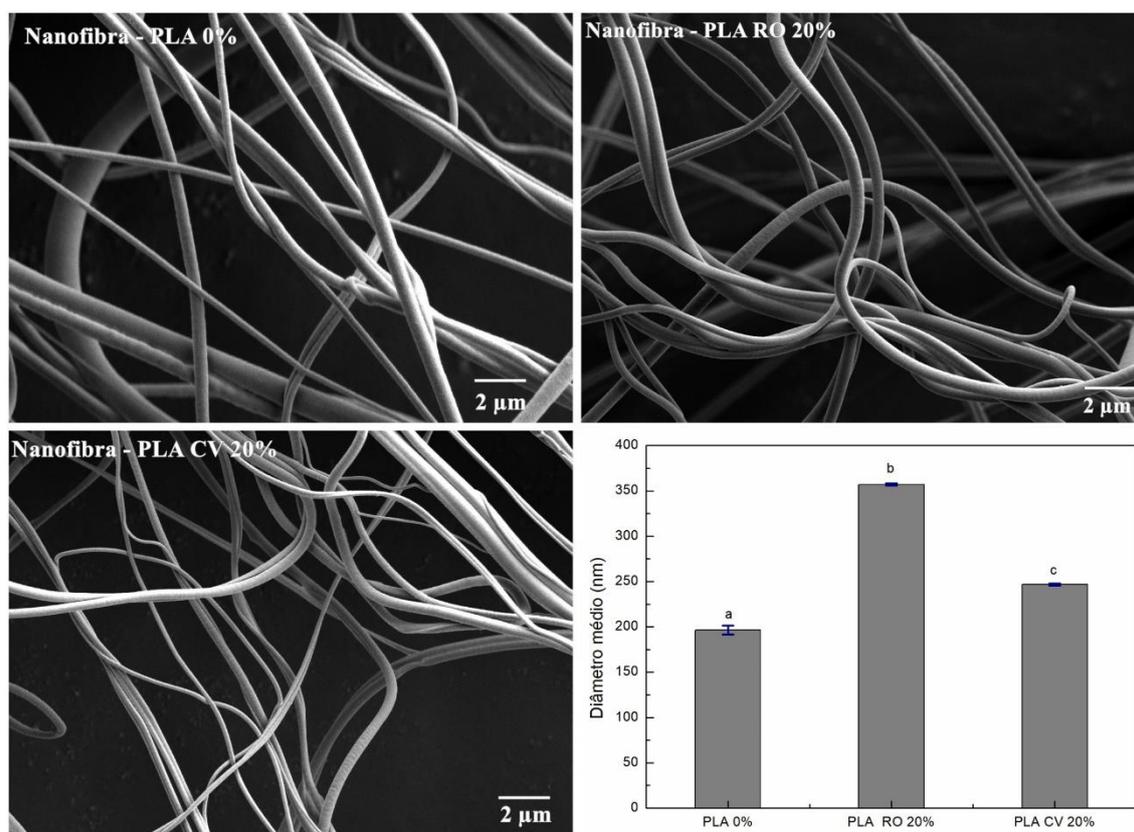
Fonte: Do autor (2023)

A caracterização química dos óleos essenciais de cada material vegetal está de acordo com aqueles encontrados na literatura (AL ZUHAIRI *et al.*, 2020; FALL *et al.*, 2017; KIRAN; PRAKASH, 2015; LUNGUINHO *et al.*, 2021; REZENDE *et al.*, 2017; SALES *et al.*, 2017). Algumas diferenças na composição e porcentagem dos constituintes químicos podem ser explicadas por fatores genéticos, bioquímicos, ambientais e sazonais do material vegetal. Entre esses fatores, podem-se destacar as estações do ano, local e horário da coleta do material vegetal, nutrição e tipo do solo e estágio vegetativo, que podem influenciar diretamente na produção de metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

3.2. Caracterização das Nanofibras

Os resultados obtidos da morfologia e diâmetro médio das nanofibras de PLA produzidas contendo óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis* por SBS estão apresentadas na Figura 2. As nanofibras obtidas apresentaram morfologia lisa, contínua, uniforme e homogênea. O diâmetro médio variou de 196 a 357 nm, em que as nanofibras com óleo essencial encapsulado resultaram, estatisticamente ($p < 0,05$), em valores de diâmetro médio maiores do que as nanofibras de PLA pura.

Figura 2 – Eletromicrografias e valores de diâmetro médio das nanofibras



Legenda: Eletromicrografias e valores de diâmetro médio das nanofibras de PLA em que PLA 0%: PLA puro; PLA RO 20%: incorporada com *R. officinalis*; PLA CV 20%: incorporada com *C. viminalis*.

Fonte: Do autor (2023)

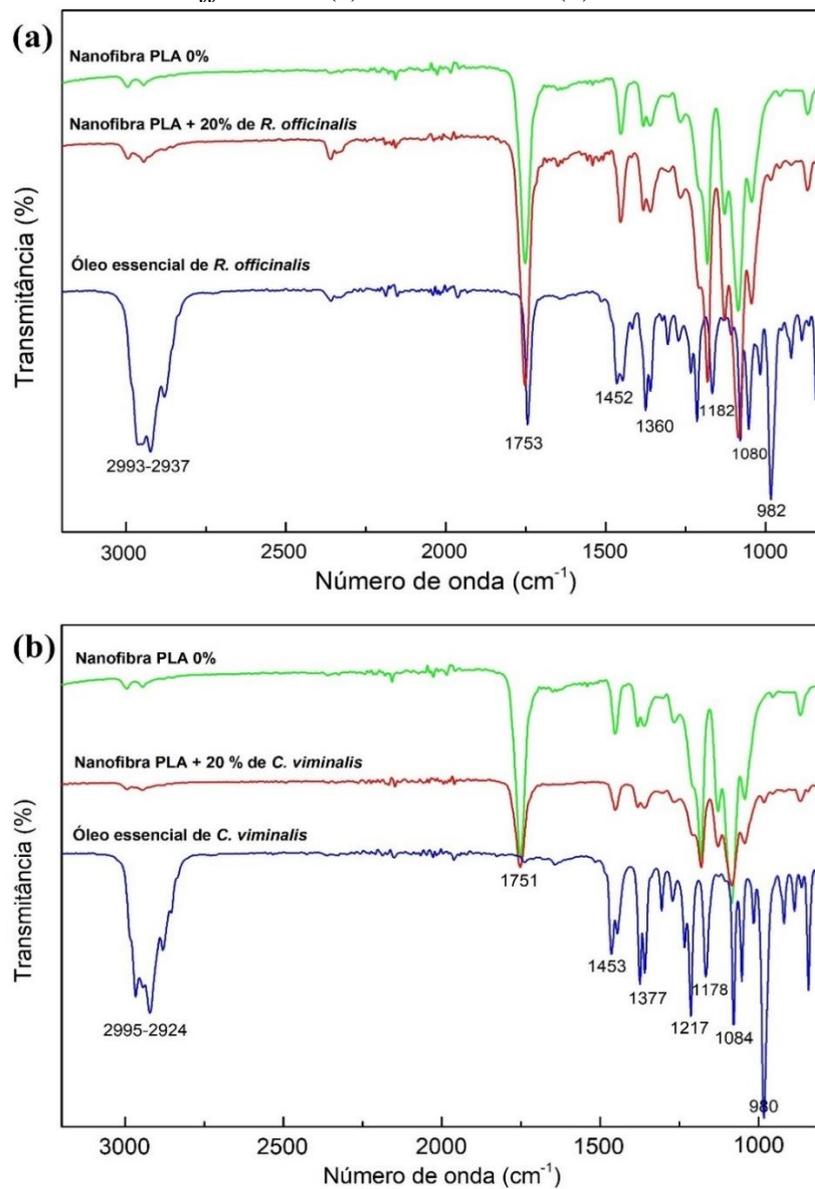
Brandão *et al.*, 2022b, estudando o óleo essencial de *Alpinia speciosa* e *Cymbopogon flexuosus* encapsulados em nanofibras de PLA, observaram aumento significativo no diâmetro médio das mantas de nanofibras após incorporação do óleo essencial. Esses resultados corroboram com os obtidos no presente estudo.

Diversos parâmetros podem interferir no processo de fiação SBS, podendo influenciar no tamanho médio do diâmetro final da fibra (MEDEIROS *et al.*, 2009). Altan, Aytac, Uyar (2018) e Mori *et al.* (2015) citaram que a incorporação de óleo essencial na solução polimérica resulta em uma solução mais viscosa e com maior tensão superficial, tendendo a formar

nanofibras com diâmetros maiores. Segundo pesquisas de Liu *et al.* (2018), isso ocorre devido à dificuldade de estiramento da gota de solução polimérica, quando é mais viscosa.

Os espectros obtidos na análise de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para os óleos essenciais, nanofibras de PLA puro e encapsuladas com óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis* estão demonstrados na Figura 3. Por meio dos espectros de FTIR, é possível identificar e verificar a frequência vibracional das substâncias que foram encapsuladas. Dessa forma, é possível comprovar que os constituintes químicos do óleo essencial foram incorporados no material polimérico e que não ocorreram reações químicas indesejáveis.

Figura 3 – FTIR do óleo essencial, nanofibra de PLA pura e incorporada com óleo essencial de *R. officinalis* (a) e *C. viminalis* (b)



Fonte: Do autor (2023)

Picos semelhantes entre as nanofibras de PLA 0% e as nanofibras de PLA incorporadas com os óleos essenciais podem ser observados nos espectros. Além disso, bandas importantes nos dois FTIR foram constatadas, como as bandas na região de 2995 a 2937 cm^{-1} presentes nos dois espectros, que correspondem à vibração de estiramento, simétrico e assimétrico, das ligações C-H, de carbono com hibridização sp^3 . Uma intensa absorção pode ser visualizada na região de 1751 cm^{-1} nos dois FTIR, correspondendo ao estiramento da carbonila (C=O), presente em abundância no PLA (ALTAN; AYTAC; UYAR, 2018; BONAN *et al.*, 2017).

As bandas na região 1452 e 1360 cm^{-1} nos dois espectros podem indicar a presença de grupos metila (CH_3) (BRANDÃO *et al.*, 2022b; NEPOMUCENO *et al.*, 2017). Os picos apresentados na região entre 1178 e 1080 cm^{-1} podem ser atribuídos à absorção de vibrações assimétricas e simétricas, respectivamente, das ligações C-O-C, presente no PLA e em moléculas do óleo essencial (OLIVEIRA *et al.*, 2013). As bandas de 982 cm^{-1} e 980 cm^{-1} presentes no espectro do óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis*, respectivamente, e em menor intensidade nas nanofibras encapsuladas com óleo essencial, corresponde a vibrações de alongamento de C-O (LIU; KIM, 2017), ao passo que as bandas em 866 cm^{-1} presentes no PLA puro e com óleo essencial corresponde às vibrações de estiramento C-COO (NEPOMUCENO *et al.*, 2017).

A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada para verificar mudanças nas propriedades térmicas das nanofibras de PLA contendo óleo essencial; os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1. Houve uma pequena diminuição na temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de cristalização (T_c) e na temperatura de fusão (T_m) para as nanofibras encapsuladas com óleo essencial em relação à nanofibra de PLA puro (PLA 0%).

Tabela 1 – Propriedades térmicas das nanofibras de PLA puro (0%) e PLA com óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis*

Amostra	T_g (°C)	T_c (°C)	T_m (°C)	ΔH_c (J g ⁻¹)	ΔH_m (J g ⁻¹)	X_c (%)
PLA 0%	60	112	166	2.5	42.3	42
PLA 20% (v/p) <i>R. officinalis</i>	58	109	164	1.9	39.6	40
PLA 20% (v/p) <i>C. viminalis</i>	57	107	165	1.5	37.2	38

Fonte: Do autor (2023)

A diminuição nos valores de T_g e T_c para as nanofibras incorporadas com óleo essencial pode estar relacionada ao efeito plastificante dos constituintes químicos do óleo essencial, que apresentam baixo peso molecular, promovendo maior mobilidade das cadeias poliméricas de PLA. Isso proporciona uma menor interação entre os grupos funcionais da cadeia polimérica, tornando-a mais flexível. Com isso, tem-se uma diminuição na energia necessária para transformar regiões amorfas em regiões cristalinas das mantas nanofibrosas, fato que pode ser comprovado pela redução nos valores de X_c , quando comparado ao da nanofibra de PLA puro (BILBAO-SAINZ *et al.*, 2014; BRANDÃO *et al.*, 2022b; MORADKHANNEJHAD *et al.*, 2020). Essa mudança no comportamento térmico do material dá origem a estruturas cristalinas mais imperfeitas que se fundem em temperaturas mais baixas (BONAN *et al.*, 2017).

3.3. Efeito Antifúngico das Nanofibras

Os resultados obtidos para a inibição de crescimento micelial das quatro espécies de fungos estão descritos na Tabela 2. Observa-se que, na concentração de óleo essencial estudada, nenhuma das nanofibras inibiu completamente o crescimento fúngico.

Tabela 2 – Efeito das nanofibras incorporadas com óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis* no crescimento micelial de fungos do gênero *Aspergillus*

Inibição do crescimento micelial (%)				
Tratamento	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. westerdijkiae</i>
PLA 0%	0 ±0.00 ^{aA}	0 ±0.00 ^{aA}	0 ±0.00 ^{aA}	0 ±0.00 ^{cA}
PLA 20% (v/p) <i>R. officinalis</i>	11.32 ±0.95 ^{bC}	0 ±0.00 ^{aD}	34.45 ±2.77 ^{bA}	16.66 ±1.30 ^{bB}
PLA 20% (v/p) <i>C. viminalis</i>	12.33 ±2.84 ^{bC}	0 ±0.00 ^{aD}	32.63 ±2.46 ^{bA}	23.81 ±2.71 ^{aB}

Legenda: Letras minúsculas idênticas na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; letras maiúsculas idênticas na linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2023)

Todas as nanofibras com adição de óleo essencial inibiram significativamente o crescimento micelial dos fungos, exceto para *A. niger*, com relação às nanofibras sem adição de óleo essencial (PLA 0%). Comparando-se os quatro fungos em estudo para a nanofibra incorporada com 20% de *R. officinalis*, pode-se observar que *A. ochraceus* foi mais sensível ao tratamento, apresentando 34,45% de inibição no crescimento micelial, o que foi observado para as nanofibras com 20% de óleo essencial de *C. viminalis*, apresentando 32,63% de inibição no crescimento de *A. ochraceus*.

Embora as nanofibras de PLA incorporadas com óleo essencial não tenham inibido completamente o crescimento fúngico, elas apresentam, geralmente, uma liberação controlada dos constituintes químicos por períodos mais longos, proporcionando um possível aumento na sua eficácia, diferentemente da ação antifúngica dos óleos essenciais livres, que frequentemente apresentam curto período de inibição por serem mais voláteis (BRANDÃO *et al.*, 2022a).

A composição química dos óleos essenciais interfere bastante no seu potencial antifúngico. A presença de compostos lipofílicos proporciona interação com a membrana plasmática do fungo, que é constituída em sua maioria por glicoproteínas e polissacarídeos. Além disso, o óleo essencial apresenta constituintes químicos que possuem caráter hidrofílico, caracterizado pela presença de grupos funcionais (fenóis, aldeídos, cetonas, álcoois e éteres), que interferem na efetividade da ação antifúngica do óleo essencial (KALEMBA; KUNICKA, 2003). Dessa forma, os óleos essenciais podem atuar em diversos alvos celulares do microrganismo, sendo capazes de alterar a permeabilidade da membrana celular, causar o vazamento de íons vitais, bem como comprometerem o seu metabolismo celular (HU *et al.*, 2017; LYU; LEE; CHEN, 2019).

3.4. Efeito Antiocratogênico

A produção de OTA pelos quatro fungos em estudo diminuiu significativamente na presença dos óleos essenciais de *R. officinalis* e *C. viminalis* incorporados em nanofibras de PLA (Tabela 3). A nanofibra de PLA 0% (pura), sem adição de óleo essencial, foi utilizada como controle negativo, mostrando que não foi capaz de inibir a síntese de OTA e o crescimento micelial dos fungos toxigênicos.

Tabela 3 – Inibição na síntese de ocratoxina A por *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* tratados com nanofibras de PLA incorporadas com óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis*

Porcentagem de inibição da produção de Ocratoxina A (%)				
Tratamento	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. westerdijkiae</i>
PLA 0%	0 ±0.00 ^c	0 ±0.00 ^c	0 ±0.00 ^c	0 ±0.00 ^c
PLA 20% <i>R. officinalis</i>	35.84 ±0.06 ^a	95.41 ±0.44 ^a	99.21 ±0.01 ^a	60.92 ±1.10 ^b
PLA 20% <i>C. viminalis</i>	19.71 ±0.06 ^b	83.80 ±2.93 ^b	96.17 ±0.02 ^b	64.96 ±0.38 ^a

Legenda: Letras minúsculas idênticas na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2023)

De modo geral, a inibição da produção de OTA foi mais elevada do que a inibição da taxa de crescimento micelial dos fungos, exceto para *A. carbonarius*, que apresentou porcentagens semelhantes nos dois casos. O tratamento com as nanofibras para *A. niger* não foi capaz de inibir seu crescimento; porém, apresentou elevada porcentagem de redução na produção de OTA, com valores entre 95,41 – 83,80%. Tais resultados mostram que, apesar da restrita inibição do crescimento micelial, as nanofibras encapsuladas com óleo essencial foram eficientes na redução da produção de OTA. A contaminação dos alimentos com essa micotoxina é um sério risco à saúde humana; logo, inibir sua produção é de extrema importância.

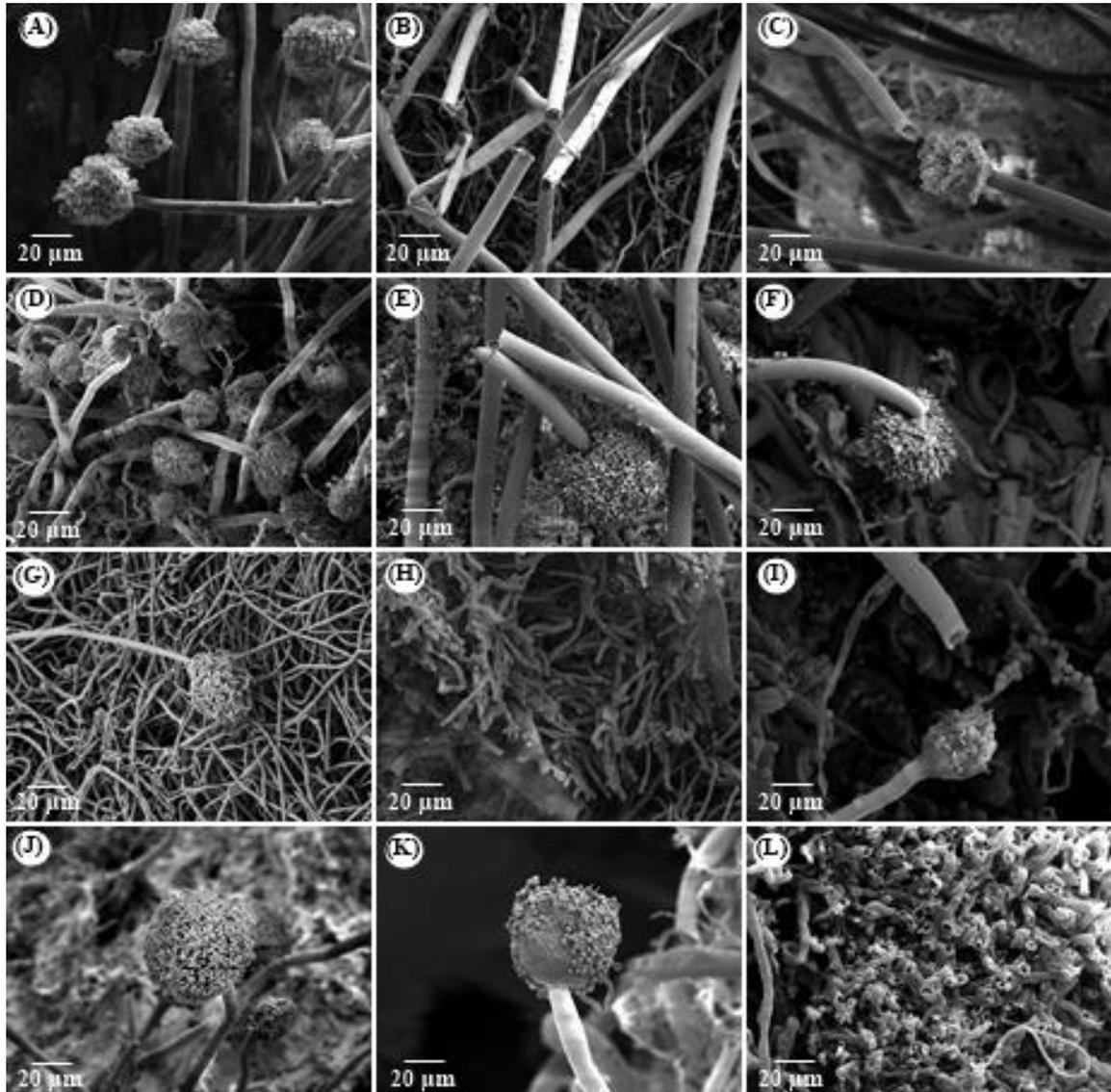
Essa diferença observada no potencial antifúngico e antiocrotogênico das nanofibras de PLA incorporadas com óleo essencial deve-se às condições específicas do fungo para produção da micotoxina, as quais são, em maioria, diferentes daquelas favoráveis para o seu crescimento. Passone, Girardi e Etcheverry (2012) e Santos *et al.* (2010) relatam que a síntese de OTA pode ser influenciada por fatores físicos, químicos e biológicos.

Os óleos essenciais, por apresentarem uma composição química diversificada, podem atuar por meio de vários mecanismos. Pesquisas de El Khoury *et al.* (2016) e Lappa *et al.* (2017) relatam que os constituintes químicos dos óleos essenciais causam efeitos nos níveis de expressão gênica, afetando na biossíntese da OTA. Além disso, outra possível ação desses constituintes, citada por Brandão *et al.* (2021) e Hua *et al.* (2014), refere-se à capacidade deles em diminuir a biomassa fúngica, inibindo a produção de substâncias importantes para o microrganismo, como o ergosterol e conseqüentemente afetando na produção de OTA.

3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura de Microrganismos

As eletromicrografias obtidas por MEV das morfologias estruturais de *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* estão apresentadas na Figura 4. A morfologia dos controles fúngicos (Figura 4A, 4D, 4G e 4J) se apresentou normal e regular, com desenvolvimento saudável dos conídios e conidióforos. As hifas mostraram-se uniformes, com superfície robusta e lisa, apresentando, também, diâmetros constantes, regulares e lineares. Porém, a presença dos óleos essenciais incorporados nas nanofibras de PLA resultou em alterações morfológicas, quando comparada aos controles fúngicos. Mudanças marcantes podem ser observadas em todo o comprimento das hifas.

Figura 4 – Eletromicrografias de varredura de *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* sem tratamento e tratados com nanofibras de PLA incorporados com óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis*



Legenda: (A), (D), (G) e (J) são controle de *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*, respectivamente. (B) e (C) *A. carbonarius* tratado com nanofibras de PLA com *R. officinalis* e *C. viminalis*, respectivamente. (E) e (F) *A. niger* tratado com nanofibra de PLA com *R. officinalis* e *C. viminalis*, respectivamente. (H) e (I) *A. ochraceus* tratado com nanofibra de PLA com *R. officinalis* e *C. viminalis*, respectivamente. (K) e (L) *A. westerdijkiae* tratado com nanofibra de PLA com *R. officinalis* e *C. viminalis*, respectivamente.

Fonte: Do autor (2023)

Analisando as micrografias eletrônicas após a exposição dos fungos com nanofibras de PLA encapsuladas com óleo essencial, é possível notar deformação, redução e perda da integridade dos conídios e hifas; com *A. carbonarius* (Figura 4B e 4C), percebeu-se grande deformação das hifas e dos conídios, apresentando estruturas colapsadas, enrugadas e com diâmetro reduzido, após os tratamentos. O mesmo pode ser observado para *A. niger* (Figura 4E e 4F), *A. ochraceus* (Figura 4H e 4I) e *A. westerdijkiae* (Figura 4K e 4L). Além disso, para *A.*

ochraceus (Figura 4H) e *A. westerdijkiae* (Figura 4L), foi observada uma completa inibição dos esporos e conídios, podendo ser visto apenas hifas bem deformadas morfológicamente, mediante tratamento com óleo essencial incorporado em nanofibra.

No trabalho desenvolvido por Rezende *et al.* (2021) utilizando o óleo essencial de *Satureja montana*, *Myristica fragrans* e *Cymbopogon flexuosus* sobre *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus*, observaram-se danos na morfologia das hifas e dos conídios, apresentando completa inibição de esporos. Tais resultados corroboram com os encontrados neste trabalho, confirmando o efeito deletério dos óleos essenciais na morfologia dos microrganismos. Essas alterações na estrutura do fungo podem estar relacionadas à capacidade dos constituintes químicos do óleo essencial em interagir com a membrana plasmática do microrganismo. Essa interação causa danos irreversíveis ao fungo, comprometendo o seu metabolismo celular (NERILO *et al.*, 2016).

4. CONCLUSÃO

O desenvolvimento das nanofibras de PLA encapsuladas com 20% (p/v) de óleo essencial de *R. officinalis* e *C. viminalis* mostraram-se eficientes, proporcionando inibição do crescimento micelial, inibição da produção de OTA e danos morfológicos nos fungos *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*.

Apesar da composição química dos óleos essenciais em estudo apresentarem compostos majoritários semelhantes, como 1,8-cineol, foram significativamente diferentes na inibição da síntese de OTA, podendo haver a influência dos compostos minoritários na ação do óleo, ou até mesmo um sinergismo entre os constituintes.

As matrizes poliméricas nanoestruturadas com óleo essencial são promissoras no desenvolvimento de novos produtos biodegradáveis, sendo uma excelente opção para aplicação na indústria agrícola e alimentícia.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Carol Stream: Allure, 2007; 804 p.
- AL ZUHAIRI, J. J. M. J. *et al.* Antioxidant, cytotoxic and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil against bacteria isolated from urinary tract infection. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 38, 101192, 2020.
- ALBUQUERQUE, P. M. *et al.* Biotechnological applications of nanoencapsulated essential oils: A Review. *Polymers*, v. 14, n. 24, 5495, 2022.
- ALTAN, A.; AYTAC, Z.; UYAR, T. Carvacrol loaded electrospun fibrous films from zein and poly(lactic acid) for active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 48-59, 2018.
- AN, P. *et al.* α -terpineol and terpene-4-ol, the critical components of tea tree oil, exert antifungal activities in vitro and in vivo against *Aspergillus niger* in grapes by inducing morphous damage and metabolic changes of fungus. **Food Control**, v. 98, n. 98, p. 42-53, 2019.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário nacional da Farmacopeia brasileira**, 6ª edição, 2019.
- BILBAO-SAINZ, C. *et al.* Solution blow spun poly(lactic acid)/hydroxypropyl methylcellulose nanofibers with antimicrobial properties. **European Polymer Journal**, v. 54, p. 1–10, 2014.
- BONAN, R. F. *et al.* Poly(lactic acid)/poly(vinyl pyrrolidone) membranes produced by solution blow spinning: Structure, thermal, spectroscopic, and microbial barrier properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n.19, 44802, 2017.
- BOONMEE, S. *et al.* Efficiency of hydroxycinnamic phenolic acids to inhibit the production of ochratoxin A by *Aspergillus westerdijkiae* and *Penicillium verrucosum*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8548, 2020.
- BRANDÃO, R. M. *et al.* Antifungal activity and the effect of the essential oil of *Lippia organoides* Kunth on *Aspergillus* mycotoxins production. **Australian Journal of Crop Science**, v. 15, n. 7, p. 1005 – 1012, 2021.
- BRANDÃO, R. M. *et al.* Antifungal and anti-carcinogenic potential of *Alpinia speciosa* and *Cymbopogon flexuosus* essential oils encapsulated in poly(lactic acid) nanofibres against *Aspergillus* fungi, *Letters in Applied Microbiology*, v. 75, n. 2, p. 281–292, 2022b.
- BRANDÃO, R. M. *et al.* Antifungal and physicochemical properties of *Ocimum* essential oil loaded in poly(lactic acid) nanofibers. **Letters in Applied Microbiology**, v. 74, p. 765-776, 2022a.
- BRANDÃO, R. M. *et al.* *In vitro* and *in vivo* efficacy of poly(lactic acid) nanofiber packaging containing essential oils from *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. against *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* in table grapes. **Food Chemistry**, v. 400, p. 134087, 2023.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CAETANO, A. R. S. *et al.* *Rosmarinus officinalis* essential oil incorporated into nanoparticles as an efficient insecticide against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Austral Entomology**, v. 61, n. 8, p. 265-272, 2022.

EL KHOURY, R. *et al.* Essential Oils Modulate Gene Expression and Ochratoxin A Production in *Aspergillus carbonarius*. **Toxins**, v. 8, n. 8, 242, 2016.

FALL, R. *et al.* Chemical characterization of essential oil from the leaves of *Callistemon viminalis* (D.R.) and *Melaleuca leucadendron* (Linn.). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 4, p. 347–351, 2017.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GUIMARÃES, L. G. D. L. *et al.* Atividades antioxidante e fungitoxica do óleo essencial de capim limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 464–472, 2011.

HU, Y. *et al.* Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. **Food Chemistry**, v. 220, p. 1-8, 2017.

HUA, H. *et al.* Inhibitory Effect of Essential Oils on *Aspergillus ochraceus* Growth and Ochratoxin A Production. **PLOS ONE**, v. 9, no 9, e108285, 2014.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Chemical agents and related occupations. IARC **Monographs on the evaluation carcinogenic risks to humans**. 100F:225-244, 2012.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, 813-829, 2003.

KIRAN, S.; PRAKASH, B. Toxicity and biochemical efficacy of chemically characterized *Rosmarinus officinalis* essential oil against *Sitophilus oryzae* and *Oryzaephilus surinamensis*. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 817–823, 2015.

LAPPA, I. K. *et al.* In vitro evaluation of essential oils against *Aspergillus carbonarius* isolates and their effects on Ochratoxin A related gene expression in synthetic grape medium. **Food Control**, v. 73, p. 71 – 80, 2017.

LIU, F. *et al.* Antimicrobial carvacrol in solution blow-spun fish-skin gelatina nanofibers. **Journal of food science**, v. 83, n. 4, p. 984-991, 2018.

LIU, Y.; KIM, H-J. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and simple algorithm analysis for rapid and non-destructive assessment of developmental cotton fibers. **Sensors**, v. 17, n. 7, 1469, 2017.

LUNGUINHO, A. S. *et al.* Acaricidal and repellent activity of the essential oils of *Backhousia citriodora*, *Callistemon viminalis* and *Cinnamodendron dinisii* against *Rhipicephalus* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 300, p. 109594, 2021.

LYU, X.; LEE, J.; CHEN, W. N. Potential natural food preservatives and their sustainable production in yeast: terpenoids and polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, 4397-4417, 2019.

MEDEIROS, E. S. *et al.* Solution blow spinning: A new method to produce micro- and nanofibers from polymer solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 113, n. 4, p. 2322–2330, 2009.

MEKONNEN, A. *et al.* In vitro antimicrobial activity of essential oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. **International journal of microbiology**, v. 2016, 2016.

MIRANDA, K. W. *et al.* Polystyrene bioactive nanofibers using orange oil as an ecofriendly solvent. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, n. 15, p. 47337, 2019.

MORADKHANNEJHAD, L. *et al.* The effect of molecular weight and content of PEG on *in vitro* drug release of electrospun curcumin loaded PLA/PEG nanofibers. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 56, 101554, 2020.

MORI, C. L. *et al.* Nanostructured polylactic acid/candeia essential oil mats obtained by electrospinning. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, 439253, 2015.

MORIE, A. *et al.* Nanofibers as novel drug carrier—an overview. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 135-143, 2014.

NEPOMUCENO, N. C. *et al.* Antimicrobial activity of PLA/PEG nanofibers containing terpinen-4-ol against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 6, 45782, 2017.

NERILO, S. B. *et al.* Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production by *Zingiber officinale* essential oil in *Aspergillus flavus*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 2, p. 286-292, 2016.

OLIVEIRA, J. E. *et al.* Structural and morphological characterization of micro and nanofibers produced by electrospinning and solution blow spinning: A comparative study. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2013, 409572, p. 1-14, 2013.

OLIVEIRA, M. M. M. *et al.* Morphological alterations in sessile cells of *Listeria monocytogenes* after treatment with *Cymbopogon* sp. essential oils. **Magistra**, v. 26, n. 3, p. 385-392, 2017.

OZCAN, I. *et al.* Characterization of solution blow spun poly (Lactic) acid based nanofibers containing suzuk spice mix essential oils. **Journal of Polymers and the Environmental**, 2023.

- PASSAMANI, F. R. F. *et al.* Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes. **Journal of food protection**, v. 77, n. 11, p. 1947-1952, 2014.
- PASSONE, M. A.; GIRARDI, N. S.; ETCHEVERRY, M. Evaluation of the control ability of five essential oils against *Aspergillus* section *Nigri* growth and ochratoxin A accumulation in peanut meal extract agar conditioned at different water activities levels. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, p. 198–206, 2012.
- REZENDE, D. A. C. S. *et al.* Characterization of the biological potential of the essential oils from five species of medicinal plants. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, p. 154-170, 2017.
- REZENDE, D. A. C. S. *et al.* Effect of the essential oils of *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H. and *Cymbopogon flexuosus* S. on mycotoxin-producing *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus* antifungal properties of essential oils. **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, p. fnab137-fnab137, 2021.
- SALES, T. A. *et al.* Essential oils from the leaves and flowers of *Callistemon viminalis*: chemical characterization and evaluation of the insecticide and antifungal activities. **American Journal of Plant Sciences**, v. 08, p. 2516-2529, 2017.
- SANTOS, L. *et al.* Effect of *Capsicum* carotenoids on growth and ochratoxin A production by chilli and paprika *Aspergillus* spp. isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 3, p. 354-359, 2010.
- TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; MAGAN, N. *Aspergillus* species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. **Current Opinion in Food Science**, v. 23, p. 38-43, 2018.
- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **J Chromatogr A**, v. 11, p. 463-471. 1963.
- WANG, H. *et al.* Comparative seasonal variation and chemical composition of essential oils from the leaves and stems of *Schefflera heptaphylla* using microwave-assisted and conventional hydrodistillation. **Industrial Crops and Products**, v. 36, n. 1, p. 229- 237, 2012.