



ALINE NORBERTO FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOFIBRAS INCORPORADAS
COM ÓLEOS ESSENCIAIS DE CRAVO, TOMILHO E
CAPIM-LIMÃO PARA O CONTROLE *in vitro* DE *Penicillium*
*digitatum***

**LAVRAS – MG
2020**

ALINE NORBERTO FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOFIBRAS INCORPORADAS COM ÓLEOS
ESSENCIAIS DE CRAVO, TOMILHO E CAPIM-LIMÃO PARA O CONTROLE *in
vitro* DE *Penicillium digitatum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dra. Elisângela Elena Nunes Carvalho

Coorientador

Dr. Juliano Elvis Oliveira

**LAVRAS – MG
2020**

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

Ferreira, Aline Norberto.

Desenvolvimento de nanofibras incorporadas com óleos
essenciais de cravo, tomilho e capim-limão para o controle *in vitro*
de *Penicillium digitatum* / Aline Norberto Ferreira. - 2020.

72 p. : il.

Orientador(a): Elisângela Elena Nunes Carvalho.

Coorientador(a): Juliano Elvis Oliveira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Nanofibras. 2. Óleos essenciais. 3. *Penicillium digitatum*. I.
Carvalho, Elisângela Elena Nunes. II. Oliveira, Juliano Elvis. III.
Título.

ALINE NORBERTO FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOFIBRAS INCORPORADAS COM ÓLEOS
ESSENCIAIS DE CRAVO, TOMILHO E CAPIM-LIMÃO PARA O CONTROLE *in vitro*
DE *Penicillium digitatum***

**DEVELOPMENT OF NANOFIBERS INCORPORATED WITH ESSENTIAL OILS
OF CLOVE, THYME AND LEMONGRASS FOR *in vitro* CONTROL OF *Penicillium*
*digitatum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 26 de junho de 2020.

Dra. Luciane Vilela Resende
Dra. Brígida Monteiro Vilas Boas

UFLA
IFSULDEMINAS – Campus Machado

Dra. Elisângela Elena Nunes Carvalho
Orientador

Dr. Juliano Elvis Oliveira
Coorientador

**LAVRAS – MG
2020**

Ao meu noivo Elias, a meus pais, irmãos, à minha tia Cleusa e a todos aqueles que desejaram e se dispuseram a me ajudar, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e presença constante em minha vida.

Ao meu amado noivo, Elias de Jesus Miranda, por ser meu verdadeiro amigo, pelo incentivo, pela força e coragem e por sempre me conduzir para o melhor caminho e nunca me deixar desistir. Por ser meu porto seguro em todos os momentos e transformar minhas angústias em esperanças.

Aos meus pais, Dehon e Neide, por me encherem de amor e dedicarem a vida à minha formação, ao me proporcionar todas as condições, para que eu pudesse chegar até aqui, por me guiarem e me apoiarem em todo o momento com carinho.

Aos meus queridos irmãos, Alex e Elisa, por serem sempre meus melhores amigos e se fazerem presentes em minha vida, mesmo que distantes, por me ajudarem nos momentos de angústia e dificuldade e por todo o carinho. À minha irmã e professora Elisa, por toda a ajuda nas análises estatísticas.

À minha Tia Cleusa que sempre nos incentivou e proporcionou condições para que pudéssemos estudar. Obrigada pelo carinho.

À minha orientadora Elisângela, por todo o apoio e conhecimento transmitidos, por entender as minhas dificuldades e me ajudar a superá-las, por nunca me desamparar e sempre fazer todo o possível para me ajudar, estando sempre disponível, com carisma, boa vontade e muito carinho.

Ao meu coorientador, Juliano Elvis Oliveira, por ser um exemplo de humildade, por todo o auxílio, dedicação e boa vontade e por estar sempre disposto transmitindo tranquilidade e confiança.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica por todo o carinho, por todas as palavras e conselhos, pelos conhecimentos trocados, pela paciência e boa vontade e por todo o auxílio e sorrisos que sempre me deram ânimo para caminhar. Em especial, à Elisa por sempre me motivar, apoiar e conduzir em meus momentos de dificuldade.

Ao Prof. Eduardo Alves, pelos conhecimentos fornecidos e pelo apoio na realização do mestrado, um exemplo de humildade e sempre nos incentivando com tranquilidade e confiança.

Ao programa de Pós-Graduação em Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares, pela oportunidade.

Aos Professores, Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto, Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci, Dr. Wilson Magela Gonçalves, Dra. Luciane Vilela Resende, Dr. Manuel Losada Gavilanes e demais do programa de plantas medicinais por todo o conhecimento e auxílio prestado no desenvolvimento do projeto.

Aos colegas da Pós-Graduação que, de alguma forma, influenciaram e me ajudaram na conclusão deste trabalho. Em especial, à Júlia que sempre demonstrou boa vontade, em nos socorrer, sempre com calma e confiança e, à Maria de Fátima, pela amizade, por toda contribuição, apoio e carinho e pela boa companhia nesta caminhada.

Aos amigos do Horto Medicinal e do Laboratório de Plantas Mediciniais e Fitoquímica, Giulia, Dico, Paulinho e Anete, pelo carinho, por toda colaboração e boa vontade, sempre nos auxiliando da melhor forma.

Aos colegas do Laboratório de Pós-colheita de Frutas e Hortaliças por toda ajuda, apoio e conhecimento, em especial, à Hanna pela assistência à elaboração do projeto e pelo apoio nas análises estatísticas.

À Rafaela, por toda a paciência, boa vontade e dedicação, ao passar todos os conhecimentos à produção e aplicação das nanofibras, sem a qual eu não teria chegado até aqui.

Ao Edinho pelo auxílio na identificação do patógeno e incorporação à coleção micológica.

À Central de Análise e Prospecção Química, ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural e ao Laboratório de Plantas Mediciniais e Fitoquímica da Universidade Federal de Lavras, e às agências de fomento Finep, Fapemig, CNPq e Capes pelo fornecimento dos equipamentos e suporte técnico para os experimentos envolvendo análises de infravermelho, microscopia e cromatografia.

A todos aqueles que se dispuseram a amparar, ainda que com uma palavra, um abraço, um sorriso e até mesmo um sermão.

MUITO OBRIGADA!

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro”.

(Fernando Sabino)

RESUMO

Penicillium digitatum é um importante patógeno pós-colheita de citros que causa grandes perdas econômicas. O controle deste patógeno é realizado com fungicidas sintéticos e, pela preocupação com a toxicidade, causada pelos fungicidas, vem crescendo a busca por métodos alternativos de controle, como o uso dos óleos essenciais. Os óleos essenciais são bastante conhecidos por suas atividades antimicrobianas, porém apresentam alta volatilidade e fácil degradação pela luz, calor e oxigênio podendo limitar sua ação. Diante disto, o nanoencapsulamento pode contribuir à sua preservação, além de permitir uma liberação controlada dos compostos ativos. Portanto este trabalho objetivou produzir nanofibras incorporadas com óleos essenciais e verificar seu efeito *in vitro* contra *Penicillium digitatum*. Nanofibras de poli (ácido láctico) (PLA), contendo óleos essenciais (OE) de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão foram produzidas, usando a técnica de fiação por sopro de solução (SBS), em delineamento experimental de mistura centroide-simplex, com três repetições do ponto central e aplicadas *in vitro* contra *Penicillium digitatum*. A microscopia óptica foi utilizada, para a identificação de *Penicillium digitatum*, e a Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa (GC-MS) para a caracterização dos óleos essenciais. As fibras de PLA-OE foram caracterizadas, utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (MEV) e espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os principais compostos dos óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão foram eugenol (83,79%); p-cimeno (46,98%) e timol (18,23%); geranial (42,69%) e neral (33,53%), respectivamente. As análises de FTIR de todas as nanofibras, contendo óleo essencial, revelaram a presença de bandas características de cada óleo. As micrografias possibilitaram a observação de fibras em disposição aleatória e com diâmetros variados e a presença de esferas em todos os tratamentos. Por meio do delineamento centroide-simplex, observou-se que as nanofibras aplicadas pelo método de fumigação apresentaram melhores resultados e, dentre elas, a nanofibra contendo óleo essencial de cravo-da-índia foi a mais eficaz, apresentando 71,79% de inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum*. A superfície de resposta e a equação do modelo estatístico, cúbico especial indicaram a formulação com 100% de OE de cravo-da-índia como a formulação ótima para o controle *in vitro* de *Penicillium digitatum*. Esses resultados confirmam o potencial das nanofibras SBS incorporadas com óleo essencial para o controle *in vitro* de *Penicillium digitatum*.

Palavras-chave: Bolor verde. Nanotecnologia. *Syzygium aromaticum*. *Thymus vulgaris*. *Cymbopogon flexuosus*.

ABSTRACT

Penicillium digitatum is an important citrus postharvest pathogen that causes major economic losses. The control of this pathogen is carried out with synthetic fungicides and, due to the concern with the toxicity caused by the fungicides, the search for alternative methods of control, such as the use of essential oils, is growing. Essential oils are well known for their antimicrobial activities, however they present high volatility and easy degradation by light, heat and oxygen and may limit its action. Given this, nanoencapsulation can contribute to its preservation in addition to allowing a controlled release of active compounds. Therefore, this work aimed to produce nanofibers incorporated with essential oils and to verify their effect *in vitro* against *Penicillium digitatum*. Poly (lactic acid) (PLA) nanofibers containing essential oils (OE) of clove, thyme and lemongrass were produced using the solution blowing (SBS) spinning technique in a centroid-simplex mixture experimental design, with three replicates from the central point, and applied *in vitro* against *Penicillium digitatum*. Optical microscopy was used to identify *Penicillium digitatum*, and Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS) to characterize essential oils. PLA-OE fibers were characterized using a scanning electron microscope (SEM) and infrared spectrometry with Fourier transform (FTIR). The main compounds of essential oils of clove, thyme and lemongrass were eugenol (83.79%); p-cymene (46.98%) and thymol (18.23%) and; geranial (42.69%) and neral (33.53%), respectively. FTIR analyzes of all nanofibers containing essential oil revealed the presence of characteristic peaks of each oil. The micrographs made it possible to observe fibers in a random arrangement and with different diameters and the presence of spheres in all treatments. Through the centroid-simplex design, it was observed that the nanofibers applied by the fumigation method showed better results and, among them, the nanofiber containing essential clove oil was the most effective with 71.79% inhibition of mycelial growth of *Penicillium digitatum*. The response surface and the special cubic statistical model equation indicated the formulation with 100% OE of cloves as the optimal formulation for the *in vitro* control of *Penicillium digitatum*. These results confirm the potential of SBS nanofibers incorporated with essential oil for the *in vitro* control of *Penicillium digitatum*.

Keywords: Green mold. Nanotechnology. *Syzygium aromaticum*. *Thymus vulgaris*. *Cymbopogon flexuosus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema de Fiação por sopro em solução (SBS) utilizado para a produção de nanofibras.	33
Figura 2 - Características morfológicas e aspectos das colônias de <i>Penicillium digitatum</i> em meio MEA e YES-ágar.....	38
Figura 3- Características morfológicas do isolado de <i>Penicillium digitatum</i>	39
Figura 4 - Sintomas típicos do bolor verde em laranjas após três dias de inoculação com <i>Penicillium digitatum</i> (A) e o controle (B) inoculado apenas com água destilada.	40
Figura 5 - Micrografias de MEV (3.000 x) das fibras de PLA obtidas por fiação por sopro em solução utilizando diferentes composições dos óleos essenciais.....	45
Figura 6 - Micrografias de MEV (10.000 x) das fibras de PLA obtidas por fiação por sopro em solução utilizando diferentes composições dos óleos essenciais.	46
Figura 7 - Espectro de FTIR das nanofibras de PLA incorporadas com óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão.....	49
Figura 8 - Espectro de FTIR das nanofibras de PLA incorporadas com as combinações duas a duas dos óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão.....	51
Figura 9 - Espectro de FTIR das nanofibras de PLA incorporadas com a combinação dos três óleos essenciais (cravo-da-índia, tomilho e capim-limão).....	52
Figura 10 - Espectro de FTIR dos óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão.	53
Figura 11 - Inibição do crescimento micelial de <i>Penicillium digitatum</i> por nanofibras incorporadas com óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão, pelo método de contato.	54
Figura 12 - Inibição do crescimento micelial de <i>Penicillium digitatum</i> por nanofibras incorporadas com óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e capim limão pelo método de fumigação.	55
Figura 13 - Diagramas de Pareto demonstrando a influência das nanofibras incorporadas com óleo essencial sobre a inibição do crescimento micelial de <i>Penicillium digitatum</i> pelos métodos de Contato (a) e Fumigação (c). Gráficos de superfície de contorno, para a otimização da inibição do crescimento micelial de <i>Penicillium</i>	

digitatum, em função das variáveis independentes, óleos essenciais de cravo, tomilho e capim-limão pelos métodos de Contato (b) e Fumigação (d)..... 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matriz experimental do planejamento de mistura.	36
Tabela 2 - Percentagem dos componentes dos óleos essenciais <i>Syzygium aromaticum</i>	41
Tabela 3 - Percentagem dos componentes dos óleos essenciais <i>Thymus vulgaris</i>	42
Tabela 4 - Percentagem dos componentes dos óleos essenciais <i>Cymbopogon flexuosus</i>	44
Tabela 5 - Diâmetro médio das nanofibras de PLA incorporadas com óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão e suas combinações (conforme delineamento experimental).....	47
Tabela 6 - Médias seguidas de desvio-padrão da porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Penicillium digitatum</i> por nanofibras incorporadas com óleo essencial de cravo-da-índia, tomilho e capim limão.	55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 <i>Citrus sinensis</i>	18
2.2 Doenças pós-colheita de citros	19
2.3 Bolor verde dos citros (<i>Penicillium digitatum</i>)	19
2.4 Óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>).....	20
2.5 Óleo essencial de cravo-da-índia (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	22
2.6 Óleo essencial de capim-limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>).....	23
2.7 Nanofibras	24
2.8 Poli (ácido láctico).....	25
2.9 Fiação por sopro de solução (SBS).....	25
2.10 Aplicação de nanofibras à preservação de alimentos	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Obtenção do isolado, identificação morfológica e incorporação à coleção micológica. 30	
3.2 Teste de patogenicidade.....	30
3.3 Obtenção do óleo essencial.....	31
3.4 Composição química dos óleos essenciais	31
3.5 Produção das nanofibras.....	32
3.6 Fiação por sopro em solução	33
3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	33
3.8 Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier– FTIR.....	34
3.9 Experimento <i>in vitro</i>	34
3.10 Delineamento experimental.....	35
3.11 Análise estatística	36

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	38
4.1 Caracterização morfológica.....	38
4.2 Teste de patogenicidade.....	40
4.3 Composição química dos óleos essenciais	41
4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	44
4.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	48
4.6 Experimento <i>in vitro</i>	53
5 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de citros e o maior exportador do suco da laranja, respondendo por mais de três quartos das exportações globais do suco da laranja (USDA, 2019). A citricultura gera cerca de 200 mil empregos diretos e indiretos e um PIB de US\$ 6,5 bilhões de dólares, em toda a cadeia produtiva, sendo de grande importância econômica e social para o país (NEVES; TROMBIN, 2017).

Penicillium digitatum é o principal fitopatógeno pós-colheita de frutas cítricas que causa o bolor verde, uma doença em que o patógeno inicia a infecção, por meio de ferimentos dos frutos e rapidamente causa sintomas de podridão mole, destruindo o fruto em poucos dias (AMORIM et al., 2018). Esta doença é responsável por 90% das perdas pós-colheita de citros, causando grandes prejuízos à citricultura e à economia mundial (BAZIOLI et al., 2019; XIN et al., 2019).

O principal método de controle do bolor verde, na pós-colheita, é a aplicação de fungicidas sintéticos. Porém, seu uso excessivo tem gerado preocupações pelos efeitos colaterais à saúde humana e contaminação do ambiente, além de acarretar no surgimento de linhagens resistentes do patógeno, o que tem levado à busca por métodos alternativos de controle, como o uso de óleos essenciais, por apresentarem baixa toxicidade, baixo impacto ambiental e, em alguns casos, alta atividade antibacteriana e antioxidante (CHEN et al., 2019; PAPOUTSIS et al., 2019).

Muitos estudos têm utilizado a aplicação de óleos essenciais para o controle de patógenos pós-colheita de frutos (ABDOLLAHI et al., 2012; ANTONIOLI et al., 2020; BOSQUEZ-MOLINA et al., 2010; DANIEL et al., 2015; GUERREIRO et al., 2016; LIU et al., 2016; MEHRA et al., 2013; PERUMAL et al., 2017). O óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) mostrou bioatividade contra diversos patógenos fúngicos pós-colheita, dentre eles, *Penicillium digitatum*. Foi comprovado que o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) é eficaz contra microorganismos patogênicos em alimentos e contribui para o aumento da vida pós-colheita de frutas (MANDAL; DEBMANDAL, 2016). A fase de vapor e o contato direto dos óleos essenciais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e tomilho inibiram totalmente o crescimento micelial de *Penicillium digitatum* (YAHYAZADEH et al., 2008) e, quando aplicados à superfície externa das laranjas, em sacos de filmes de polietileno, reduziram efetivamente o bolor verde e azul, causado por *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum*, respectivamente (YAHYAZADEH et al.,

2009). Contudo os óleos essenciais são altamente voláteis, hidrofóbicos e facilmente degradáveis pela exposição à luz, ao calor e ao oxigênio, o que limita sua aplicação.

Diante disto, muitos pesquisadores encapsularam o óleo essencial, a fim de proporcionar melhor proteção contra possíveis degradações e permitir uma liberação controlada dos compostos bioativos presentes no óleo essencial (ANTONIOLI et al., 2020; CHAUDHARI et al., 2019; HEYDARIAN et al., 2020; KFOURY et al., 2015; MEHRAN et al., 2020; PARIS et al., 2020; RADÜNZ et al., 2020). Diferentes polímeros têm sido amplamente utilizados para encapsular e aumentar a estabilidade e a bioatividade dos óleos essenciais. Dentre eles, o poli (ácido-lático) é biodegradável, biocompatível, obtido de recursos renováveis e aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA, para uso em materiais, que entram em contato com alimentos (LIU et al., 2017).

Entre os métodos de encapsulamento, a fiação por sopro em solução é uma técnica que permite a produção de fibras nanométricas com incorporação de óleos essenciais. A nanotecnologia se destina à produção de produtos com propriedades químicas, físicas, elétricas e mecânicas únicas. As nanofibras apresentam alta área de superfície e suas mantas podem ser altamente porosas com elevada interconectividade da rede formada, podendo apresentar ainda excelentes propriedades mecânicas, dependendo do polímero utilizado (BUZEA et al., 2007; DIAS et al., 2019; FANG et al., 2008).

Diversas técnicas foram desenvolvidas, para a produção de micro e nanofibras poliméricas, dentre elas, a técnica Solution Blow Spinning (SBS) ou fiação por sopro em solução, desenvolvida por Medeiros e colaboradores (2009), como alternativa à técnica *electrospinning* para a produção de fibras poliméricas. O SBS permite a deposição de fibras em, praticamente, qualquer alvo, possibilitando a deposição direta no alvo de interesse, incluindo tecidos vivos. Além disso, o SBS emprega procedimentos semelhantes aos utilizados, na produção industrial de fibras, possibilitando seu uso à produção, em larga escala, expandindo ainda mais as possibilidades de aplicações potenciais nas mais diferentes áreas (BARHOUM et al., 2019; DARISTOTLE et al., 2016; NUNES DA SILVA et al., 2019).

Portanto, pela importância social e econômica da produção da laranja e as grandes perdas, causadas pelos patógenos pós-colheita, associadas à toxicidade causada pelos fungicidas e à alta volatilidade e fácil degradação, apresentada pelos óleos essenciais e, pelas ainda as excelentes características, apresentadas pelas nanofibras, este trabalho objetivou produzir nanofibras incorporadas com óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e capim-

limão, pela técnica SBS e verificar seu efeito *in vitro* no controle do patógeno pós-colheita de citros, *Penicillium digitatum*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Citrus sinensis*

O gênero *Citrus* compreende muitas espécies produtoras de algumas das melhores e mais cultivadas frutas do mundo, ricas também em óleo essencial (HUSSAIN et al., 2019). A laranjeira, cujo nome científico é *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, é uma angiosperma pertencente à família Rutaceae e ao gênero *Citrus* (FLORA, 2019). É uma planta arbórea com troncos castanhos acinzentados, copa densa e arredondada, apresentando folhas simples, arredondadas e aromáticas. Suas flores são brancas e bissexuais e têm um perfume doce. Os frutos são redondos com 6-10 cm de diâmetro, com uma casca ligeiramente áspera de cor amarela ou laranja. A polpa é succulenta e cheia de sacos de sucos membranosos (FRANCO-VEGA et al., 2016; ROUSSOS, 2015).

Os frutos da laranjeira são abundantes em açúcares simples e fibras dietéticas e são fonte de ácido fólico, tiamina, niacina, vitamina B6, riboflavina, ácido pantotênico, potássio, cálcio, fósforo, magnésio e cobre. Além disso, apresentam baixa densidade energética e são livres de sódio e colesterol. Contêm, ainda, uma série de antioxidantes naturais derivados do óleo, polpa, sementes e cascas que, potencialmente, protegem a saúde (LIU et al., 2012; ROSA, 2013).

Registros apontam que a laranja é originária do sul asiático, provavelmente da China. Na Idade Média, foi levada pelos árabes para a Europa e introduzida no Brasil pelos Portugueses, logo no início da colonização (INGLESE; SORTINO, 2019; NEVES et al., 2011). Atualmente o cultivo dos citros ocorre, em diversos países, principalmente em áreas tropicais e subtropicais (GIUFFRÈ et al., 2019).

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja e o maior exportador do suco da laranja, respondendo por mais de três quartos das exportações globais de suco de laranja. Na safra 2017/2018, a produção global de laranja atingiu 47,9 milhões de toneladas e a expectativa é de uma expansão de 54,3 milhões em 2018/2019, em razão do clima favorável, no Brasil e nos Estados Unidos, dois dos mais importantes produtores de laranja do mundo. Nesta mesma safra, o Brasil produziu 15,9 milhões de toneladas com uma estimativa de 20,1 milhões de toneladas para a safra de 2018/2019 (USDA, 2019).

A citricultura gera 200 mil empregos diretos e indiretos e um PIB de US\$ 6,5 bilhões de dólares, em toda a cadeia produtiva, sendo de grande importância econômica e social para o país (NEVES; TROMBIN, 2017). Entretanto há muitas doenças que causam perdas

importantes a esse setor, dentre elas, as doenças de pós-colheita que podem ser de origem física, fisiológica ou patológica.

2.2 Doenças pós-colheita de citros

O manuseio pós-colheita destina-se à seleção de frutas com máxima qualidade, ao aumento da vida pós-colheita e à redução de perdas (PALOU, 2014). Em geral, as perdas de frutas pós-colheita são de difícil controle e são influenciadas por diversos fatores, como as condições de colheita, armazenamento, comercialização, modificações físicas e bioquímicas e atividade microbiana (MATTOS, 2010).

Os principais patógenos fúngicos pós-colheita de citros são *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* e *Geotrichum citri-aurantii*, que causam o bolor verde, o bolor azul e a podridão azeda, respectivamente. Dentre eles, *Penicillium digitatum* representa 90% das perdas pós-colheita (BAZIOLI et al., 2019; XIN et al., 2019).

Penicillium digitatum é um patógeno que penetra no fruto pelas feridas e produz uma grande quantidade de esporos (conídios) que são transportados pelo ar, reproduzindo assexuadamente e infectam o fruto por feridas causadas por insetos, galhos ou manipulação humana inadequada durante a colheita (PAPOUTSIS et al., 2019).

2.3 Bolor verde dos citros (*Penicillium digitatum*)

O bolor verde, uma das principais doenças pós-colheita de citros, está disseminado em todas as regiões produtoras de citros do mundo (COSTA et al., 2019; PALOU, 2014). A manifestação da doença depende de condições climáticas adequadas (temperaturas em torno de 24°C) e da forma de manipulação dos frutos desde o pomar até o consumidor. A infecção ocorre por fermentos, em que os nutrientes estão disponíveis e estimulam a germinação dos esporos (POLLETTINI, 2019).

Os sintomas se iniciam pelo aparecimento de pequenas lesões circulares moles com aspecto encharcado, deprimido e descolorido com posterior desenvolvimento de micélio branco, na superfície do fruto e o desenvolvimento, no centro do micélio, de uma massa de esporos de coloração verde que chega a tomar todo o fruto. Os esporos maduros soltam-se facilmente dos frutos podendo ser disseminados pelo manuseio ou pelo ar (AMORIM et al., 2018).

O agente causal do bolor verde é *Penicillium digitatum*, um Ascomycota, pertencente à ordem Eurotiales que apresenta conídios com tamanho entre 4 a 7 µm x 6 a 8 µm, com formato ligeiramente cilíndrico a ovalado, produzidos em forma de cadeias (catenulados), podendo variar de forma e tamanho. Esses conídios sobrevivem saprofiticamente em pomares e são disseminados pelo vento penetrando em ferimentos dos frutos. Os conidióforos são simples com terminação penicilada (em forma de pincel, *Penicillus* = pincel em latim), terminando num grupo de fiálides. As hifas são septadas e colonizam o substrato, liberando enzimas que decompõem as substâncias mais complexas, provocando a podridão nos frutos. A fase perfeita (sexuada) é rara na natureza (LARANJEIRA et al., 2005).

O controle do bolor verde deve iniciar no campo, com medidas que evitem o ferimento dos frutos e práticas sanitárias, visando eliminar as fontes do inóculo (PALOU et al., 2015). Os fungicidas químicos são os principais agentes utilizados, para o controle do bolor verde, porém, alguns deles não são permitidos, em determinados países e seu uso causa grande preocupação com a saúde e meio ambiente, além de seu uso extensivo levar ao desenvolvimento de cepas resistentes resultando em quebra da eficiência (LI et al., 2019; PAPOUTSIS et al., 2019; TALIBI et al., 2014).

Sendo assim, tem crescido a busca por métodos alternativos de controle, visando à redução do uso de fungicidas com resultados promissores ao controle de diferentes fitopatógenos, dentre eles, o uso de óleos essenciais, pois apresentam baixa toxicidade, baixo impacto ambiental e, em alguns casos, alta atividade antimicrobiana e antioxidante, além de proporcionarem baixo risco de desenvolvimento de resistência por patógenos pela presença de inúmeros compostos químicos que atuam em diferentes mecanismos de ação (CHEN et al., 2019; PAPOUTSIS et al., 2019).

2.4 Óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)

Thymus vulgaris, conhecido popularmente como tomilho, é uma planta aromática, muito utilizada na culinária, pertencente à família Lamiaceae e nativo da região Mediterrânea. É uma planta perene, subarborescente, de pequeno porte (10-30 cm de altura) com ramos eretos e lenhificados na base e folhas pequenas, opostas e oblongo-lanceoladas, levemente pubescentes, de coloração mais clara na face inferior. Produz inflorescência de flores pequenas de cor branca ou violeta clara e propaga-se por sementes (LORENZI, 2008; STAHL-BISKUP; VENS-KUTONIS, 2012).

O óleo essencial de *T. vulgaris* é armazenado, em tricomas glandulares peltados e é composto, principalmente por monoterpenos, dentre eles, o timol, o carvacrol e o p-cimeno. Essa espécie apresenta uma grande variabilidade química, ou seja, a mesma espécie produz um conjunto distintamente diferente de metabólitos secundários. Os sete quimiotipos dessa espécie foram caracterizados como timol, carvacrol, linalol, geraniol, thujanol-4, terpineol e 1,8-cineol (TRINDADE et al., 2018).

O quimiotipo timol é o mais frequente, caracterizado pela presença dos monoterpenos timol (30-35%), carvacrol (1-5%), p-cimeno (15-20%), 1,8-cineol (0,2–14,2%), linalol (2,2-4,8%), α -pineno (0,9–6,6%), γ -terpineno (5-10%), e, em porcentagens menores (0,5-1,5%), borneol, cânfora, limoneno, mirceno, β -pineno, *trans*-sabineno hidratado, α -terpineol e terpinen-4-ol. Frequentemente, os éteres metílicos de timol e carvacrol estão presentes e o sesquiterpeno β -cariofileno (1-3%) (KAZEMI, 2015; SALEHI et al., 2019; STAHL-BISKUP; VENSKUTONIS, 2012).

O óleo essencial de tomilho apresenta atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas, anti-helmínticas, inseticidas, antiespasmódicas, antisséptica, expectorante e carminativa. Essas ações normalmente são atribuídas ao timol e a seu isômero carvacrol, que geralmente constituem de 40 a 50% desse óleo essencial (SALEHI et al., 2019; SIMÕES et al., 2017).

Esse óleo tem grande importância na indústria de alimentos, sendo utilizado como intensificador de sabor e conservante, por suas atividades antimicrobiana e antioxidante. Foi comprovado que o óleo essencial de tomilho é eficaz contra microrganismos patogênicos em alimentos e contribui para o aumento da vida pós-colheita de frutas (ELSHAFIE et al., 2015; FATEMI et al., 2011; MANDAL; DEBMANDAL, 2016; NABIGOL; MORSHEDI, 2011).

Alimentos colonizados por fungos têm sua vida útil reduzida e, muitas vezes, são inapropriados ao consumo pela presença de micotoxinas. O óleo essencial de tomilho exibiu forte atividade antifúngica fumigante contra os fungos fitopatogênicos *Raffaelea quercus-mongolicae* e *Rhizoctonia solani* (KIM et al., 2019). O crescimento radial de *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum* foi completamente inibido por *Thymus vulgaris* (500 mg/L) (AZIZI et al., 2008).

Os óleos essenciais de tomilho e cravo-da-índia inibiram completamente o crescimento de *Penicillium digitatum*, quando adicionados ao meio $600 \mu\text{L}^{-1}$ ou por seus voláteis com $24 \mu\text{L}$ por placa (YAHYAZADEH et al., 2008). Abdollahi et al. (2011) observaram efeito inibitório significativo, no crescimento de micélios de *Penicillium digitatum*, na concentração de 600 e $100 \mu\text{L}^{-1}$ e inibição completa de *Rhizopus stolonifer*. O

encapsulamento do óleo essencial de tomilho (*Thymus daenensis* L.) e endro (*Anethum graveolens* L.), em nanopartículas de prata, aumentou sua atividade fungicida contra *Colletotrichum nymphaeae*, causador de antracnose em muitas culturas hortícolas (WEISANY et al., 2019).

2.5 Óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*)

Syzygium aromaticum, também conhecido como cravo-da-índia, é uma árvore de porte médio da família Myrtaceae, nativa das ilhas Maluk, ao Leste da Indonésia. Apresenta copa alongada, podendo alcançar de 8 a 10 metros de altura, com folhas ovais, lisas e aromatzadas. Suas flores são longo-pedunculadas, pequenas, aromáticas de coloração rósea ou avermelhada formando numerosos grupos de cachos terminais. Os frutos são do tipo drupa elipsoide de coloração avermelhada. Seu produto comercial, o cravo-da-índia, consiste no botão floral desidratado, muito utilizado, sobretudo, como condimento e aromatzante, por seu aroma e sabor marcante, atribuídos ao eugenol (GRANDI, 2014; LORENZI, 2008).

A partir dos botões florais e das folhas de *S. aromaticum*, é extraído o óleo essencial constituído principalmente por eugenol (70-85%), acetato de eugenila (15%) e β -cariofileno (5-12%) (HAMAD et al., 2017; MITTAL et al., 2014; PILAR SANTAMARINA et al., 2016).

Este óleo apresenta diversas propriedades farmacológicas, como atividades antibacteriana, antifúngica, inseticida, antioxidante, anticâncer, analgésica e anti-inflamatória. Essas atividades são atribuídas, em especial, ao eugenol que apresenta uma ampla aplicação na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética e agrícola (KAMATOU et al., 2012; MITTAL et al., 2014).

Em virtude de atividades antioxidantes e antimicrobianas, o óleo essencial de cravo-da-índia e seu principal constituinte, o eugenol, são utilizados na indústria de alimentos como conservante e na indústria agrícola, para proteger os alimentos de microrganismos, durante o armazenamento (KAMATOU et al., 2012).

Diversos estudos comprovam a eficácia desse óleo quanto a fitopatógenos. O óleo de cravo-da-índia mostrou atividade antifúngica máxima contra *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*, *Fusarium moniliforme*, *F. solani* e *Penicillium sp.* isolados de grãos de milho (SHIRURKAR; WAHEGAONKAR, 2012) e, também, foi eficaz contra cinco fungos fitopatogênicos pós-colheita do grão de arroz (PILAR SANTAMARINA et al., 2016).

Cepas de *Aspergillus flavus* foram fortemente inibidas pelo óleo de cravo-da-índia (BOUKAEW, 2017) que também inibiu a produção de aflatoxina B1 em queijos (MOOSAVI-NASAB et al., 2017).

Em um estudo realizado por Kloucek et al. (2012), utilizando o método de volatilização em disco, o óleo de cravo-da-índia inibiu os fungos *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* e *Penicillium digitatum*. El-Gali (2018) comparou a atividade antifúngica dos óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho, gergelim, cominho preto e canela contra *P. digitatum*, e o óleo de cravo-da-índia foi o mais eficaz, mostrando 100% de inibição do crescimento micelial na concentração de 1%. *P. digitatum* e *P. italicum* foram completamente inibidos pelos óleos essenciais de tomilho, orégano e cravo-da-índia, quando adicionados ao meio a $1000 \mu\text{L}^{-1}$ ou por seus voláteis com $10 \mu\text{L}$ por placa (PLAZA et al., 2004).

Entre 14 óleos essenciais, o óleo da folha de cravo-da-índia produziu a maior zona de inibição contra *Penicillium digitatum* (HALL; FERNANDEZ, 2004). Além disso, o contato direto e a fase de vapor foram utilizados, para testar a atividade antifúngica de quatro óleos essenciais contra *P. digitatum*, e os óleos de cravo-da-índia e tomilho apresentaram a maior toxicidade e inibiram totalmente o crescimento micelial (YAHYAZADEH et al., 2008). Foi observada redução no crescimento micelial e conidiação nos isolados de *Penicillium digitatum* submetidos à ação do óleo essencial de cravo-da-índia ($200 \mu\text{L}^{-1}$) (MARTÍNEZ; GONZÁLEZ, 2013).

O tomilho ou o óleo de cravo-da-índia a 100/200/400 ou $800 \mu\text{L}^{-1}$, aplicados à superfície externa das laranjas, em sacos de filmes de polietileno, reduziram efetivamente o bolor verde e azul, causados por *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum*, respectivamente (YAHYAZADEH et al., 2009).

2.6 Óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*)

Cymbopogon flexuosus, também conhecido como capim-limão, é uma planta herbácea da família Poaceae, nativa da Índia (DA SILVA GÜNDEL et al., 2018). É uma grama perene adornada e aromática, com 2 metros de altura. Suas folhas são lineares e lanceoladas, medindo de 50-120 cm de comprimento e 0,25-2,0 cm de largura. As inflorescências são em espiguetas dispostas em panículas. São identificadas duas variedades dessa espécie, o capim vermelho (*Cymbopogon flexuosus* var. *flexuosus*), que apresenta o caule e a bainha das folhas avermelhados ou roxos e o capim branco (*C. flexuosus* var. *albescens*) que é caracterizado pela cor branca do caule. O capim vermelho é preferido para

uso em perfumaria, pois seu óleo essencial tem maior porcentagem de citral, qualidade superior e boa solubilidade em álcool (SKARIA et al., 2012).

Essa espécie produz um óleo essencial com aroma de limão, amplamente utilizado em sabores e fragrâncias, perfumarias, alimentos e produtos farmacêuticos (GUPTA et al., 2016). Os principais constituintes do óleo são geranial (citral a - 51,19%), neral (citral b - 26,21%), geraniol (5,00%), citronelol (0,44%), nerol (2,20%), limoneno (2,42%), acetato de geranil (1,95%), linalol (1,34%), citronelal (0,37%), α -pineno (0,24%), cariofileno (0,32%) e mircenol (0,46%) (SKARIA et al., 2012).

Estudos têm mostrado que esse óleo essencial apresenta atividades antibacterianas, antifúngicas, antileveduras, inseticidas, repelentes, anti-inflamatórias, anticâncer, alelopáticos e antioxidante (GANJEWALA, 2009).

As atividades antifúngicas e antibacterianas do óleo de capim-limão contra diferentes espécies microbianas foram documentadas, e vários estudos foram realizados para determinar a eficácia do óleo essencial de capim-limão na preservação de diferentes tipos de alimentos (ABDULAZEEZ et al., 2016; SHARMA et al., 2009).

O óleo essencial de *C. flexuosus* mostrou bioatividade contra os patógenos fúngicos pós-colheita, *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum capsici*, *C. falcatum*, *Curvularia lunata*, *Fusarium cerealis*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. udum*, *Gloeosporium fructigenum*, *Penicillium expansum*, *P. italicum*, *P. implicatum*, *P. digitatum*, *P. minio-luteum*, *Botrytis cinerea*, *Helminthosporium oryzae*, *H. maydis*, *Phoma violace* e *Rhizopus nigricans* (SHAHI et al., 2003)

A antracnose do feijão foi controlada pela atividade antifúngica direta do óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* e fosfito de potássio e pela indução de enzimas de defesa (SILVA et al., 2015).

Um estudo realizado por da Silva Gündel et al. (2018) mostrou que a nanoencapsulação do óleo de *C. flexuosus* aumentou sua eficácia terapêutica contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* inibindo a formação do biofilme bacteriano.

2.7 Nanofibras

A nanotecnologia é uma tecnologia aplicada à escala nanométrica (1 a 100 nm) que se destina a produzir materiais, produtos e dispositivos com propriedades únicas ou

aprimoradas, tendo em vista que, quando uma matéria é estruturada em nanoescala, apresenta propriedades químicas, físicas, elétricas e mecânicas únicas. O prefixo “nano”, deriva do grego “nanos”, que significa “anão”. O nanômetro é uma unidade de medida de comprimento que corresponde a um bilionésimo de metro ou 10^{-9} m. As nanofibras são estruturas que apresentam o diâmetro, em uma dimensão menor que $1 \mu\text{m}$, enquanto seu comprimento pode alcançar alguns metros (BUZEA et al., 2007).

As nanofibras surgiram como uma importante classe de nanomateriais e têm sido intensamente investigadas, em uma ampla gama de áreas, por apresentarem propriedades particulares, como alta área de superfície, por seus pequenos diâmetros e pelo fato das mantas de nanofibras serem altamente porosas com elevada interconectividade da rede formada, podendo apresentar ainda excelentes propriedades mecânicas, dependendo do polímero utilizado (DIAS et al., 2019; FANG et al., 2008). Nanofibras podem ser produzidas, a partir de uma ampla gama de polímeros, dentre eles, o poli (ácido láctico) (PLA), um poliéster alifático derivado do ácido láctico.

2.8 Poli (ácido láctico)

É um material ecológico, que pode ser obtido, a partir de recursos agrícolas renováveis, que contêm amido ou açúcar, como milho, trigo, cana-de-açúcar e beterraba. Dentre os materiais ecológicos poliméricos de base biológica, o poli (ácido láctico) (PLA) é considerado o mais promissor, por ser transparente, biodegradável, biocompatível, compostável e apresentar excelentes propriedades mecânicas, boa processabilidade e não toxicidade (AURAS et al., 2010; FARAH et al., 2016). Além disso, o PLA é aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA para uso em materiais que entram em contato com alimentos (LIU et al., 2017).

Em razão dessas características, o PLA tem extensa aplicação na indústria de embalagens, como embalagens de alimentos, nas indústria têxtil e na área biomédica, em suturas, curativos, como material de fixação óssea, liberação controlada de medicamentos e scaffolds para engenharia de tecido (MADHAVAN NAMPOOTHIRI et al., 2010). Diversas técnicas foram desenvolvidas, para a produção de micro e nanofibras poliméricas, dentre elas, a técnica Solution Blow Spinning (SBS) ou fiação por sopro em solução.

2.9 Fiação por sopro de solução (SBS)

Essa técnica foi desenvolvida por Medeiros e colaboradores (2009), como alternativa à técnica *electrospinning* para a produção de fibras poliméricas. É um método de preparação de micro/nanofibras, a partir de soluções poliméricas, usando ar pressurizado e um bico especializado. Nessa técnica de fiação, o polímero é solubilizado, em um solvente volátil e essa solução polimérica é injetada por um bico interno no interior de um tubo concêntrico. De forma simultânea um jato acelerado de ar, passa por um tubo externo concêntrico, controlado por um regulador de pressão. Uma bomba de injeção controla a taxa de injeção da solução polimérica. O jato é acelerado, em direção ao coletor e, durante o voo, ocorre a evaporação do solvente e conseqüente produção das fibras que se arranjam na forma de uma manta não tecida. A morfologia e o diâmetro das fibras estão relacionados a fatores, como o tipo de polímero, a concentração da solução polimérica, a taxa de injeção da solução, o fluxo de ar, a distância de trabalho (distância entre a ponta do tubo interno e o coletor) e a distância de protusão do tubo interno em relação ao externo (DIAS et al., 2019; MEDEIROS et al., 2009).

O SBS permite a deposição de fibras em, praticamente, qualquer alvo, possibilitando a deposição direta no alvo de interesse, incluindo tecidos vivos. Além disso, o SBS emprega procedimentos semelhantes aos utilizados, na produção industrial de fibras, possibilitando seu uso na produção em larga escala. Esse fato expande ainda mais as possibilidades de aplicações potenciais, nas mais diferentes áreas, como na área de construção civil, em polímeros reforçados e materiais de autocura; na produção, conversão e armazenamento de energia, em baterias, supercapacitores, células a combustível e células solares; na melhoria e proteção ambiental, como a filtração de ar, tratamento de águas residuais e purificação de águas de abastecimento; na área biomédica, em sistema de administração de medicamentos, purificação do sangue, engenharia de tecidos e cicatrização e, na indústria de alimentos, como revestimentos e embalagens (BARHOUM et al., 2019; DARISTOTLE et al., 2016; NUNES DA SILVA et al., 2019).

2.10 Aplicação de nanofibras à preservação de alimentos

Diversos estudos foram desenvolvidos visando à produção de nanofibras, contendo constituintes ativos, com a finalidade de controlar patógenos, preservar e prolongar a vida útil dos alimentos.

Mantas de poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) eletrofiadas, contendo óleo essencial de orégano, extrato de alecrim e extrato de chá verde apresentaram altas

propriedades antimicrobianas e antioxidantes, podendo ser aplicadas como camadas ativas para prolongar a vida útil dos alimentos (FIGUEROA-LOPEZ et al., 2019).

Os óleos essenciais de *Mentha piperita* e *Salvia officinalis* foram incorporados, em nanofibras de PLA e mostraram maior toxicidade por contato que os óleos essenciais puros, para controlar larvas de primeiro ínstar de *Plodia interpunctella*, por mais tempo e com eficiência de liberação lenta (ALLAHVAISI et al., 2017).

Nanofibras de gelatina de pele-de-peixe, incorporadas com carvacrol, foram produzidas pela técnica SBS e apresentaram efeitos inibitórios ao crescimento de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes* (LIU et al., 2018).

Lee et al. (2020) propuseram a fabricação de nanofibras funcionais antimicrobianas infundidas com óleo essencial, para aplicações em embalagens, a fim de prolongar a vida útil das frutas. As nanofibras eletrofiadas à base de poliuretano e óleo essencial de tea tree mostraram-se eficientes no controle de *E. coli* e *Staphylococcus aureus*.

Atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli* também foi verificada, em mantas de nanofibras de poli (ϵ -caprolactona) (gel), contendo óleo essencial de cravo-da-índia (UNALAN et al., 2019) e em membrana de nanofibra carboximetil quitosano/óxido de polioxiétileno (YUE et al., 2018).

Nanofibras carregadas com óleo essencial de canela, tomilho e lavanda apresentaram boas propriedades antibacterianas contra *S. aureus* (RAFIQ et al., 2018), e fibras eletrofiadas de quitosana / poli (ϵ -caprolactona), contendo 5% de óleo essencial de orégano, eliminaram o crescimento de quatro cepas bacterianas diferentes *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* e *E. coli* (HASANPOUR ARDEKANI-ZADEH; HOSSEINI, 2019).

Uma emulsão à base de polivinilpirrolidona, gelatina e óleo essencial de tomilho e outra emulsão de polivinilpirrolidona, contendo óleo essencial de canela, foram eletrofiadas levando à produção de nanofibras que demonstraram atividade antibacteriana por difusão em disco contra *S. aureus*, *E. coli*, *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa* (CENGİZ ÇALLIOĞLU et al., 2019; KESICI GÜLER et al., 2018).

Moléculas de nisina foram encapsuladas em nanofibras isoladas de proteína vegetal pelo processo de eletrofição e obtiveram-se alta proteção e diminuição, na interação com componentes alimentares, aumentando a sua atividade antimicrobiana contra *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Leuconostoc mesenteroides*, em queijo fresco e suco de maçã (SOTO et al., 2019).

Nanofibras de poli (ácido láctico) (PLA) e polivinilpirrolidona (PVP) carregadas com óleo de Copaíba (*Copaifera sp.*) foram produzidas por SBS e apresentaram ação antimicrobiana contra *S. aureus* (BONAN et al., 2015).

Vafania et al. (2019) produziram nanofibras eletrofiadas de quitosana/gelatina e óleo essencial de tomilho que apresentaram efeito bactericida contra *Clostridium perfringens*.

Terpinen-4-ol, um dos principais fitoconstituintes do óleo de *Melaleuca alternifolia*, foi adicionado a nanofibras SBS de poli (ácido láctico) e poli (etileno glicol) que mostraram eficácia semelhante ao controle positivo, gluconato de clorexidina, contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (NEPOMUCENO et al., 2018).

Nanofibras de gelatina, contendo óleo essencial de tomilho e nanopartículas de β -ciclodextrina e ϵ -polilisina foram manipuladas, para controlar a propagação de *Campylobacter jejuni* em aves, mostrando resultados promissores à preservação da carne sem impacto na avaliação sensorial (LIN et al., 2018).

Munhuweyi et al. (2018) observaram excelentes atividades antifúngicas *in vitro* contra *Botrytis sp.*, que causa o mofo cinza (uma importante doença pós-colheita em romãs), ao utilizar nanofibras ativas de quitosana/álcool polivinílico, derivadas da precipitação de β -ciclodextrina com óleos essenciais de canela e orégano.

Compósitos poliméricos de nanofibras eletrofiadas, infundidos com extratos de moringa, apresentaram efeito fungicida, *in vitro* e *in vivo* quanto ao patógeno *Aspergillus niger*, sugerindo seu emprego na preservação de alimentos passíveis de deterioração por este patógeno (DE LA RAMA et al., 2019).

Miranda et al. (2019) utilizaram óleo de laranja como solvente para a produção de fibras SBS de poliestireno que demonstrou atividade antimicrobiana quanto ao fitopatógeno *Alternaria alternata*.

Nanofibras de zeína carregadas com curcumina foram testadas quanto à limitação do decaimento pós-colheita, em maçãs revestidas por eletrofiação, infectadas com *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea*, resultando na redução em 50% da lesão, em maçãs infectadas por *Penicillium expansum*, demonstrando o potencial de fibras como materiais antifúngicos de embalagem de alimentos (YILMAZ et al., 2016).

Membranas fibrosas compostas de zeína e PLA, com 20% de conteúdo de carvacrol, inibiram 99,6 e 91,3% do crescimento de fungos, indicando que são boas candidatas a aplicações ativas de embalagens de alimentos para prolongar a vida útil do pão integral (ALTAN et al., 2018).

Nanofibras de zeína e óleo de semente de rosa mosqueta, produzidos por eletrofiação coaxial, prolongaram efetivamente o prazo de validade de bananas e laranjas kinkan descascadas e segmentadas, mostrando-se uma rota de embalagem fácil para melhorar a sustentabilidade dos alimentos e reduzir o desperdício (YAO et al., 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do isolado, identificação morfológica e incorporação à coleção micológica

O isolamento e identificação do patógeno foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras. O isolado foi obtido, a partir de lesões em laranjas, adquiridas em supermercado local no município de Lavras, MG.

Para o isolamento direto do fungo, foi realizada a transferência, com o auxílio de um estilete, de estruturas do patógeno (esporos e hifas), para placas de Petri, contendo meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) (ALFENAS; MAFIA, 2007). As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas em BOD a 25° C e fotoperíodo de 12 horas, até a observação de crescimento micelial, quando as culturas foram sucessivamente repicadas, para placas de Petri, com meio MEA (Malt Extract Agar), para a obtenção de culturas puras. O meio YES (Yeast Extract Sucrose) ágar também foi utilizado para a verificação das características das colônias.

O fungo (*Penicillium digitatum*) foi identificado, por meio de preparações em lâminas e observações ao microscópio de luz, baseando-se em suas características morfológicas. Após a identificação, o isolado foi incorporado à Coleção Micológica do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

3.2 Teste de patogenicidade

Para verificar a patogenicidade do isolado, cinco laranjas cultivar Pêra foram previamente lavadas em água corrente e desinfestadas com hipoclorito de sódio a 20 mg.L⁻¹ por três minutos. Foram marcados pontos distintos, na região mediana das frutas e realizados ferimentos de 2 mm de profundidade, com o auxílio de multiagulhas (cinco furos). Em cada ponto, foram aplicados 20 µL de suspensão, contendo de 2 x 10⁵ conídios.mL⁻¹. Em seguida, as frutas foram envolvidas em sacos plásticos transparentes e umedecidas de modo a formar uma câmara úmida com temperatura e umidade relativa média de 25±2 °C e 90± 5%, respectivamente, por 48h. Após a remoção dos plásticos, as frutas permaneceram em bancada até o aparecimento das lesões típicas do microorganismo (AMORIM et al., 2018). O controle foi inoculado apenas com água destilada.

As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras.

3.3 Obtenção do óleo essencial

Os óleos essenciais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) foram escolhidos, mediante o potencial de inibição ao patógeno observado, em trabalhos anteriores (SHAHI et al., 2003; YAHYAZADEH et al., 2008) e foi adquirido, com 100% de pureza, diretamente da empresa Laszlo Aromaterapia LTDA, situada em Belo Horizonte-MG.

3.4 Composição química dos óleos essenciais

As análises da composição química dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoquímica do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. Os óleos essenciais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização em chamas (CG-DIC) e cromatografia acoplada a um detector de espectrometria de massas (CG-EM), em um sistema Agilent® 7890^a equipado com coluna capilar de sílica fundida HP-5 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme) (Califórnia, EUA).

Os óleos essenciais foram diluídos, separadamente em acetato de etila (1%, v/v) e injetados, automaticamente no cromatógrafo, usando um volume de injeção de 1,0 µL, para os óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Cymbopogon flexuosus* e 0,8 µL para o óleo essencial de *Thymus vulgaris*. As análises ocorreram no modo split a uma razão de injeção de 1:50, 1:30 e 1:20, respectivamente, para os óleos essenciais de *Syzygium aromaticum*, *Thymus vulgaris* e *Cymbopogon flexuosus*. Para todos os óleos essenciais, o gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1 mL/min. Para o óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, as temperaturas do injetor e detector foram 250°C e 300°C, respectivamente, com temperatura inicial de 60°C e uma rampa de temperatura de 3°C/min até 240°C, seguida de uma rampa de 10°C/min até 280°C, mantendo-se em condição isotérmica por 15 minutos. Para o óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*, a temperatura do injetor foi de 250°C com temperatura inicial de 60°C e uma rampa de temperatura de 3°C/min. até 300°C. Para o óleo

essencial de *Thymus vulgaris*, as temperaturas do injetor e detector foram 230°C e 290°C, respectivamente, com temperatura inicial de 60°C, permanecendo por 1,5 min, seguida de três rampas de temperatura: 3°C/min até 100°C, 4°C/min até 200°C e 10°C/min até 240°C.

Todas as análises foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos pela média da porcentagem de área normalizada maior que 5% dos picos cromatográficos \pm desvio padrão (n=3). As análises químicas dos óleos essenciais foram realizadas, em um Cromatógrafo Agilent® 5890A, equipado com detector de ionização em chama (CG-DIC) e detector seletivo de massas Agilent 5975C (CG-EM), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. As condições operacionais do CG-EM foram as mesmas empregadas, nas análises por CG-DIC, conforme a espécie vegetal.

Os constituintes químicos dos óleos essenciais foram tentativamente identificados pela comparação de seus índices de retenção relativos à coinjeção de uma solução padrão de n-alcenos (C8-C20, Sigma-Aldrich®, Si. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca do National Institute of Standards and Technology (NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2017). Os índices de retenção foram calculados, usando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963) e, para as atribuições, foram consultados índices de retenção citados em literatura (ADAMS, 2017).

3.5 Produção das nanofibras

As fibras foram produzidas no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico do Departamento de Física da Universidade Federal de Lavras. As mantas de micro/nanofibras foram produzidas, a partir de uma solução polimérica, contendo poli (ácido láctico) (NatureWorks® 3251D) diluído em clorofórmio (Vetec) na concentração de 12% (p/v). Para cada manta, foram preparados 20 mL da solução em um béquer que foi mantido fechado para impedir a volatilização do solvente. A solução foi diluída com o auxílio de um agitador magnético por, aproximadamente, 40 minutos.

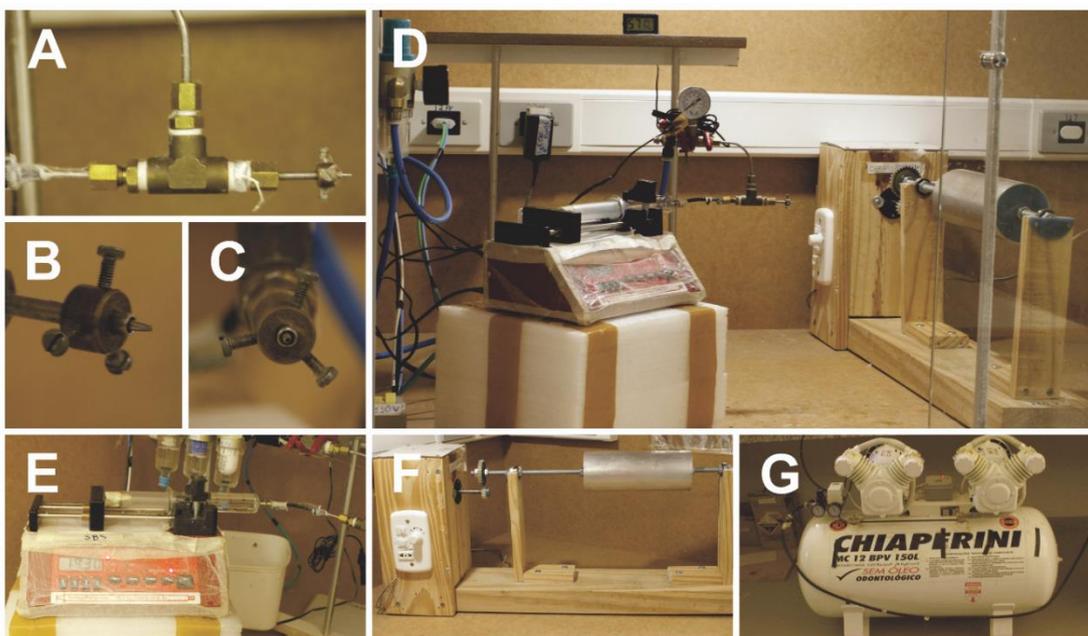
Após a completa diluição do poli (ácido láctico) (PLA), foram adicionados os óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho, capim limão e suas combinações, na proporção de 20% em relação ao peso do polímero utilizado e diluídos em um agitador magnético por 15 min.

A solução polimérica foi transferida para uma seringa de vidro de 20 mL e conectada ao sistema de fiação por sopro em solução.

3.6 Fiação por sopro em solução

O sistema de fiação por sopro em solução (FIGURA 1) consistiu em um bocal concêntrico no qual a solução polimérica foi alimentada pelo bocal interno e o ar pressurizado foi alimentado pelo bocal externo por um compressor (CHIAPERINI MC 12 BPV 150L). A distância de protrusão do bocal interno, em relação ao externo, foi mantida em 4 mm. O controle da taxa de alimentação da solução polimérica foi realizado por uma bomba de seringa (NE - 300; New Era Pump Systems), na qual uma seringa de vidro de 20 mL (Artiglass), contendo a solução polimérica, foi acoplada e conectada ao bocal interno. A taxa de injeção da solução polimérica foi de 6 mL.h^{-1} e a pressão do ar utilizada foi 20 Psi. A pressão do ar foi controlada por um regulador de pressão conectado ao bocal externo. Um coletor, sob rotação, foi colocado a uma distância de 20 cm em relação ao bocal concêntrico (distância de trabalho). As fibras foram depositadas neste coletor, recoberto previamente com papel alumínio.

Figura 1 - Sistema de Fiação por sopro em solução (SBS) utilizado para a produção de nanofibras.



Aparato usado na fiação por sopro em solução. A: sistema de tubos concêntricos; B: detalhe da protrusão do tubo interno em relação ao externo; C: detalhe da concentricidade dos tubos interno e externo; D: Sistema de SBS; E: Sistema de injeção da solução polimérica; F: Coletor e G: compressor. Fonte: Do autor (2020).

3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural, situada no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. Com o intuito de verificar a morfologia e o diâmetro das fibras, as mantas de nanofibras foram produzidas por 10 min para se obter mantas finas que permitissem a visualização das fibras isoladas e a sua medição.

Fragmentos do papel alumínio, contendo as mantas de nanofibras, foram colados em stubs de alumínio com o auxílio de uma fita dupla face de carbono e recobertos com ouro utilizando-se um aparelho evaporador de ouro BAL-TEC 050.

Posteriormente, as amostras foram levadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura LEO Evo 40 para realização da análise.

Os diâmetros das fibras foram avaliados pelo software ImageJ (National Institutes of Health, USA). Para cada amostra, o diâmetro médio e sua distribuição foram determinados a partir da análise de pelo menos 100 fibras escolhidas aleatoriamente.

3.8 Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier– FTIR

A técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR foi realizada, na Central de Análise e Prospecção Química, situada no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras e foi empregada, para examinar a presença de grupos funcionais dos compostos orgânicos, contidos nas mantas poliméricas, bem como avaliar a incorporação dos óleos essenciais na matriz polimérica. As análises foram realizadas para as mantas de PLA pura e com as diferentes composições dos óleos essenciais utilizados. Foi empregado um espectrômetro FT-IR Varian 600-IR com transformada de Fourier (FTIR), com acessório GladiATR da Pike Technologies acoplado, para medidas por reflectância total atenuada (ATR) a 45° com cristal de seleneto de zinco. A faixa espectral analisada foi de 400 a 4.000 cm^{-1} e a resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras.

3.9 Experimento *in vitro*

Os estudos *in vitro* foram executados, para avaliar a atividade antifúngica das nanofibras, combinadas ou não com óleo essencial e foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras.

Foram utilizados dois métodos, para avaliar a ação das nanofibras, quanto ao patógeno de interesse, o método de contato direto e o método de fumigação (volatilização do óleo essencial). No primeiro método, as mantas de nanofibras, incorporadas ou não com óleo essencial, conforme a Tabela 1, foram cortadas em discos circulares de 20 mm de diâmetro e colocadas, no centro de placas de Petri, contendo meio MEA. No segundo método, as mantas foram cortadas em discos circulares de 5 cm e coladas nas tampas das placas de Petri.

Após a solidificação dos meios de cultura, discos miceliais de 5 mm foram retirados da periferia da cultura e depositados no centro das placas de Petri. As placas foram vedadas com papel filme e incubadas em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 h durante 10 dias.

Foram feitas duas repetições de cada tratamento e cada um foi avaliado em triplicata. As placas de Petri foram distribuídas ao acaso nas prateleiras em delineamento inteiramente casualizado.

O crescimento micelial foi avaliado no décimo dia, medindo-se, com o auxílio de um paquímetro digital, o diâmetro das colônias em dois sentidos opostos. A porcentagem de inibição foi calculada a partir da Equação 1.

$$I = \left[\frac{C-T}{C} \right] \times 100 \quad (1)$$

Em que I= porcentagem de inibição; C= diâmetro da colônia (mm) do controle; T= diâmetro da colônia (mm) do tratamento.

3.10 Delineamento experimental

Para os experimentos *in vitro*, foi utilizado o planejamento experimental de mistura centroide-simplex, para avaliar o efeito da adição dos três componentes da mistura, óleos essenciais de cravo-da-índia (x_1), tomilho (x_2) e capim-limão (x_3). O delineamento para três componentes (TABELA 1) foi composto de sete ensaios com três repetições no ponto central para fornecer uma estimativa interna do erro, totalizando nove tratamentos (TABELA 1). O crescimento micelial foi utilizado como variável de resposta.

Tabela 1 - Matriz experimental do planejamento de mistura.

Formulações	Proporção		
	Óleo essencial de Tomilho	Óleo essencial de Cravo-da-índia	Óleo essencial de Capim-limão
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	½	½	0
5	0	½	1/2
6	½	0	1/2
7	1/3	1/3	1/3
8	1/3	1/3	1/3
9	1/3	1/3	1/3

Fonte: Do autor (2020).

A proporção, para cada óleo essencial, foi expressa como uma fração da mistura e, para cada combinação de tratamento, a soma das proporções dos componentes foi igual a 100%, como demonstrado na Equação 2.

$$\sum xi = x_1 + x_2 + x_3 = 100 \% \quad (2)$$

3.11 Análise estatística

Os dados do experimento *in vitro* foram analisados, utilizando-se a superfície de mistura em nível de 5% de significância, obtendo-se uma superfície de resposta e a equação do modelo estatístico melhor ajustado. O tratamento dos dados foi realizado utilizando o programa Statistica ® 7 (STATSOFT, 2007). Para os dados da inibição do crescimento micelial, foi realizado um experimento em delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial 2x9, sendo dois métodos (contato e fumigação) e nove formulações (conforme delineamento experimental). A significância foi verificada pelo teste F em nível de 5%. Os dados do diâmetro das fibras foram analisados pela análise de variância em nível de 5% de significância, utilizando-se o software R (R CORE TEAM, 2017), após a verificação da normalidade e homogeneidade. A significância foi verificada pelo teste F da

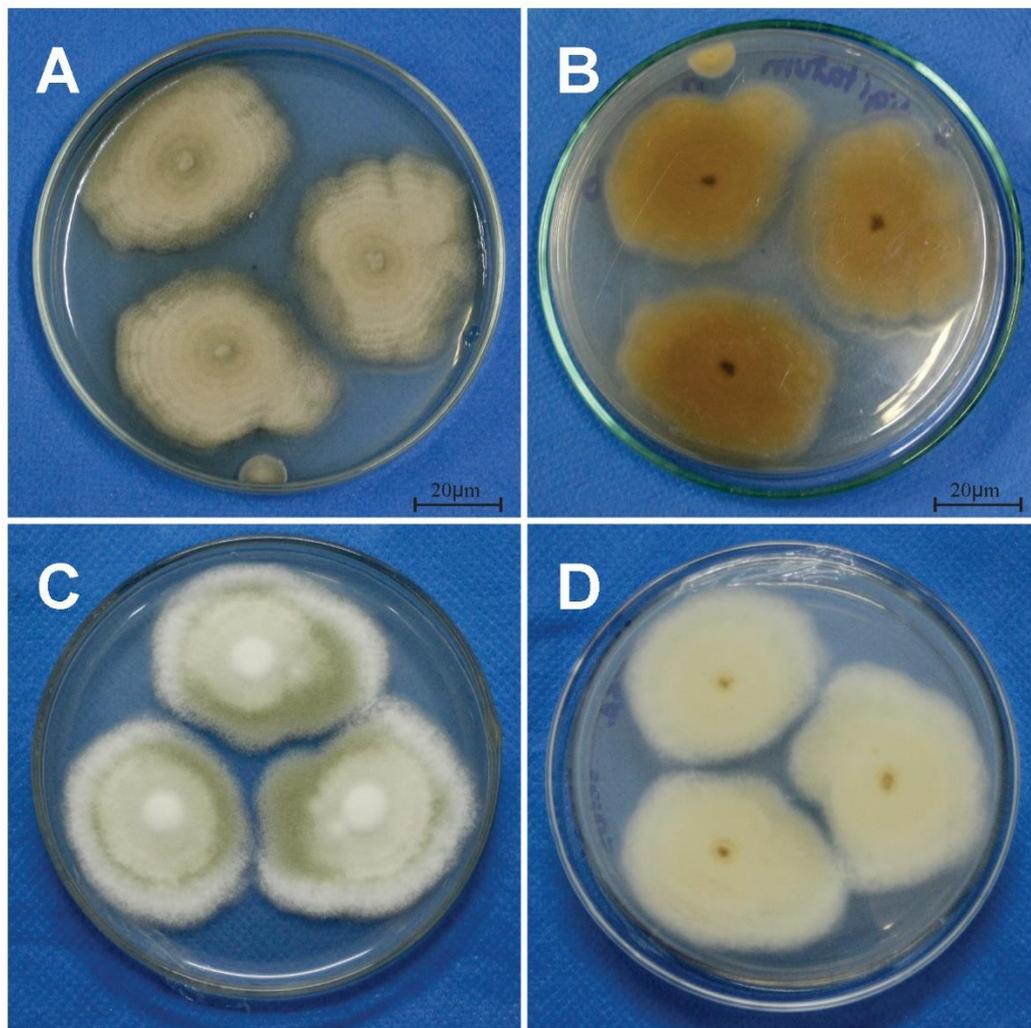
análise de variância e, quando significativo, foi aplicado o teste de Scott Knott em nível de 5% de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização morfológica

Os isolados da laranja apresentaram colônias de coloração branca com textura aveludada com posterior desenvolvimento de conídios de coloração verde-oliva. No reverso da placa, as colônias apresentaram coloração pálido a ligeiramente marrom. As colônias cultivadas, em meio MEA, apresentaram crescimento esparso com baixa esporulação enquanto as colônias cultivadas, em meio YES-ágar, apresentaram crescimento rápido com forte esporulação (FIGURA 2).

Figura 2 - Características morfológicas e aspectos das colônias de *Penicillium digitatum* em meio MEA e YES-ágar

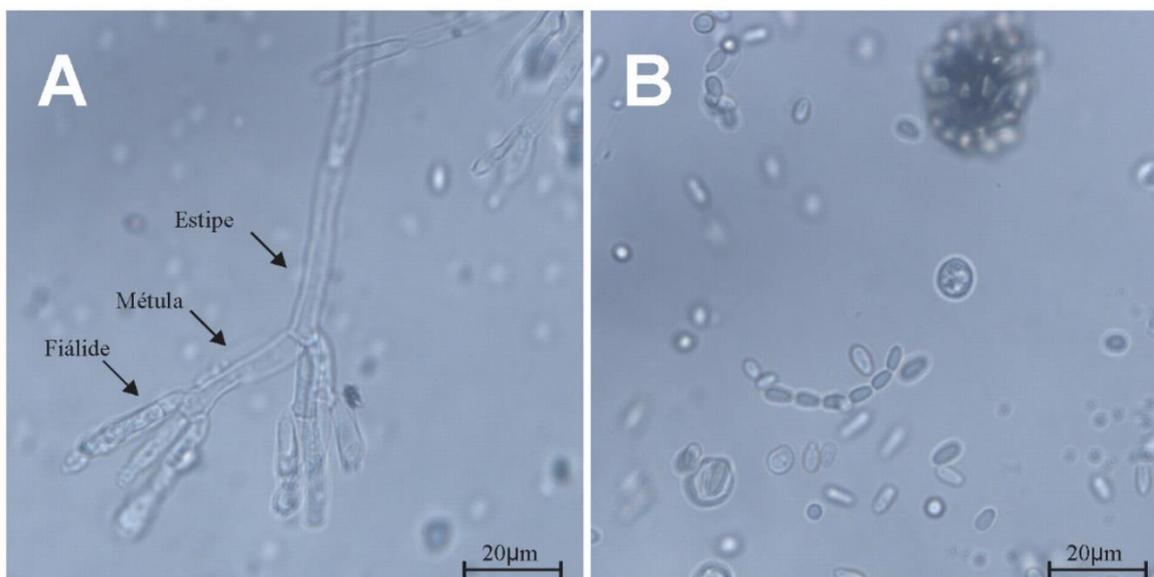


Colônias de *Penicillium digitatum* em meio de cultura MEA (10 dias), frente (A) e verso (B) e YES-ágar (7 dias), frente (D) e verso (E). Fonte: Do autor (2020).

De acordo com Pitt e Hocking (2009), em meio MEA, *Penicillium digitatum* apresenta colônias de aspecto aveludado com crescimento esparso, medindo de 35 a 70 mm e produz conídios verde-oliva ou verde-amarelado opaco, o reverso da placa é pálido ou acastanhado. Em meio ágar malte, *Penicillium digitatum* se espalha, é aveludado, suave e empoeirado (PEBERDY, 1987). Em meio YES-ágar (YESA), o grau de esporulação é forte, de coloração bege para avelã, no verso da placa e apresenta crescimento rápido (diâmetro de 44-76 mm depois de sete dias) (SAMSON et al., 2010).

Os micélios de *P. digitatum* cultivados, em meio MEA, apresentaram hifas septadas e conidióforos irregularmente ramificados, com terminação penicilada, formado por estipes com poucas métulas, terminando em um grupo de fiálides. Fiálides longas, variando em tamanho (15,2-20,5 μm x 2,1-5,7 μm), com formato ampuliforme consistindo de uma parte basal cilíndrica com um pescoço curto (FIGURA 3). Quando melhor desenvolvidos, os conidióforos são terverticilados, mas frequentemente biverticilados ou irregulares. As fiálides podem apresentar forma de balão a cilíndrica com 10 a 20 μm de comprimento (PITT; HOCKING, 2009).

Figura 3- Características morfológicas do isolado de *Penicillium digitatum*.



Conidióforo (A) e conídeos (B) de *Penicillium digitatum*. Fonte: Do autor (2020).

P. digitatum se reproduz assexuadamente pela produção de esporos ou conídios assexuais (PEBERDY, 1987). Foram observados conídios hialinos, medindo de 4,1-12,05 μm x 2,4-5,2 μm , constituídos por uma única célula elipsoidal a cilíndrica formando cadeias

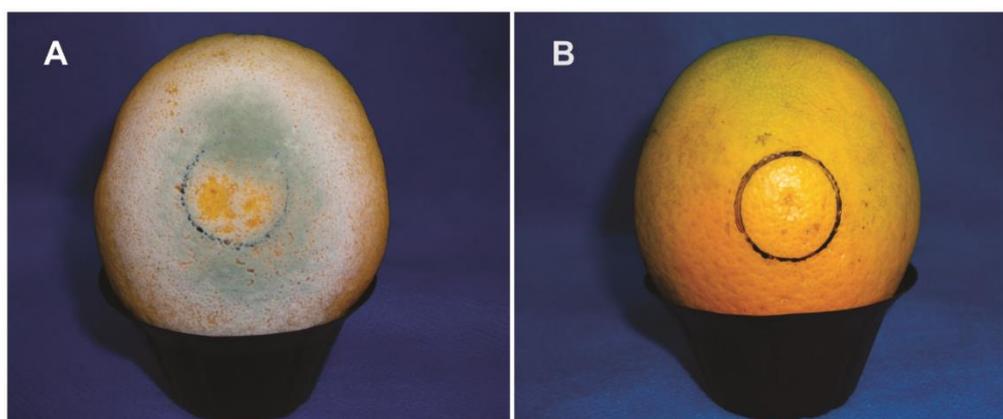
(catenulados) (FIGURA 3B). De acordo com Pitt e Hocking (2009), os conídios são lisos, com formato variando de esférico a cilíndrico, embora seja frequentemente vista uma forma oval. O aparelho de conidiação é muito frágil e tende a se dividir em vários elementos celulares (PALOU, 2014).

A produção de conídios verde-amarelo a azeitona e a estreita associação da espécie *Penicillium digitatum* com a podridão causada em frutos cítricos contribui para sua distinção macroscópica das demais espécies. Essa espécie é única em sua combinação de características. As estruturas conidióforas são irregulares e grandes para o gênero *Penicillium*. Apresentam-se na forma biverticilado, em vez de terverticilado, e os conídios são grandes e elipsoidais a cilíndricos de coloração verde-oliva (FRISVAD; SAMSON, 2004). Além disso, nenhuma outra espécie de *Penicillium* produz consistentemente grandes fiálides ou conídios (PITT; HOCKING, 2009).

4.2 Teste de patogenicidade

O isolado utilizado, no presente estudo, mostrou-se patogênico em todas as laranjas inoculadas. Foram observadas pequenas lesões circulares moles com aspecto encharcado, deprimido e descolorido com posterior desenvolvimento de micélio branco na superfície do fruto e o desenvolvimento, no centro do micélio, de uma massa de esporos de coloração verde (FIGURA 4). De acordo com Costa et al. (2019), no início da infecção por *Penicillium digitatum*, ocorre o desenvolvimento de um ponto aquoso mole na casca das frutas que se torna um micélio branco com posterior produção de esporos verde-oliva.

Figura 4 - Sintomas típicos do bolor verde em laranjas após três dias de inoculação com *Penicillium digitatum* (A) e o controle (B) inoculado apenas com água destilada.



Fonte: Do autor (2020).

O controle, inoculado apenas com água destilada, não apresentou nenhum sintoma (FIGURA 4). Esses resultados comprovam a patogenicidade da espécie identificada e confirmam o agente etiológico da doença do bolor verde em laranja.

4.3 Composição química dos óleos essenciais

A cromatografia gasosa possibilitou verificar a composição química dos óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão.

No óleo essencial de cravo-da-índia, foram identificados quatro compostos, representando 99,67% da composição total do óleo essencial (TABELA 2). O eugenol (83,79%) foi o principal constituinte seguido de (*E*)-cariofileno (13,38%) e α -humuleno (2,10%). Resultado semelhante foi obtido por Farias et al. (2019) que identificaram como componentes principais do óleo essencial do cravo-da-índia, eugenol (77,4%), (*E*)-cariofileno (7,29%) e humuleno (1,14%). Jirovetz et al. (2006) identificaram 23 constituintes, entre eles o eugenol (76,8%), seguido pelo β -cariofileno (17,4%), α -humuleno (2,1%) e acetato de eugenila (1,2%) como componentes principais. Alawiyah et al. (2019) encontraram quatro componentes dominantes, no óleo essencial das folhas de *S. aromaticum*, eugenol (73,25%), *trans*-cariofileno (19,43%), 3-alil-6-metoxifenol (2,92%) e α -humuleno. Outros autores também apontaram o eugenol como o principal componente do óleo essencial de *S. aromaticum* (NARDONI et al., 2019; YAHYAZADEH et al., 2008). Esse composto tem sido associado às altas atividades antioxidantes (JIROVETZ et al., 2006) e antimicrobianas, sendo ativo contra fungos e uma ampla gama de bactérias gram-negativas e gram-positivas (MARCHESE et al., 2017b).

Tabela 2 - Percentagem dos componentes dos óleos essenciais *Syzygium aromaticum*.

<i>Syzygium aromaticum</i>				
Nº	Compostos	IR	IR Lit.	% Área
1	Eugenol	1367	1356	83,79 ± 0,20
2	E-cariofileno	1424	1417	13,38 ± 0,06
3	α -humuleno	1458	1452	2,10 ± 0,01
4	Óxido de cariofileno	1587	1586	0,42 ± 0,12

IR: índice de retenção; IR Lit: índice de retenção do composto de acordo com a literatura; % Área: percentagem do composto. Fonte: Do autor (2020).

Dos 14 compostos identificados no óleo essencial de tomilho, ρ -cimeno (46,98%) apresentou o maior teor, seguido de timol (18,23%), carvacrol (10,61%) e canfeno (10,20%) (TABELA 3). Estudos têm mostrado que os isômeros timol e carvacrol apresentam excelentes atividades antimicrobianas, podendo inibir o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de apresentarem efeitos antifúngicos e antibiofilme e, embora o ρ -cimeno seja menos eficiente como agente antimicrobiano que os seus derivados, timol e carvacrol, ele é responsável por potencializar a atividade antimicrobiana desses compostos (MARCHESE et al., 2017a; MEMAR et al., 2017).

Tabela 3 - Percentagem dos componentes dos óleos essenciais *Thymus vulgaris*.

<i>Thymus vulgaris</i>				
Nº	Compostos	IR	IR Lit.	% Área
1	α -pineno	931	932	3,72 \pm 0,05
2	Canfeno	946	946	10,20 \pm 0,11
3	β -mirceno	993	991	2,06 \pm 0,00
4	α -terpineno	1015	1014	0,24 \pm 0,00
5	ρ -cimeno	1024	1024	46,98 \pm 0,06
6	1,8 cineol	1029	1031	0,34 \pm 0,00
7	Hidrato de <i>cis</i> -sabineno	1056	1065	0,27 \pm 0,00
8	Linalol	1100	1100	0,89 \pm 0,00
9	Terpinen-4-ol	1175	1174	0,24 \pm 0,00
10	α -terpineol	1189	1186	3,24 \pm 0,01
11	γ -terpineol	1196	1199	0,97 \pm 0,00
12	Timol	1294	1289	18,23 \pm 0,04
13	Carvacrol	1303	1298	10,61 \pm 0,02
14	E-cariofileno	1418	1417	0,28 \pm 0,00

IR: índice de retenção; IR Lit: índice de retenção do composto de acordo com a literatura; % Área: percentagem do composto. Fonte: Do autor (2020).

Nos estudos de Iseppi et al. (2019), o ρ -cimeno (39,18%), seguido de timol (25,05%) e γ -terpineno (5,25%), foram os principais compostos. O óleo essencial de *T. vulgaris* foi caracterizado por altos teores de ρ -cimeno (36,36%) e timol (24,35%) e componentes menores variando de 7,5 a 1,17% (VINCIGUERRA et al., 2019). Em contrapartida, Jianu et al. (2015) identificaram carvacrol (44,6%) e ρ -cimeno como componentes majoritários. Por

outro lado, Quesada et al. (2016) constataram 1,8-cineol (12%), cânfora (11%), borneol (9%), α -terpineol (6%), terpinen-4-ol (6%) e canfeno (5%) como principais compostos do óleo essencial de *T. vulgaris*.

Essas diferenças químicas podem ser explicadas pela variedade de subespécies vegetais e pelos diferentes quimiotipos encontrados nas espécies de *Thymus*. O quimiotipo timol é o mais frequente em *T. vulgaris*. A variação entre os principais compostos do óleo essencial pode ser explicada pelas relações biossintéticas existentes entre seus componentes. O timol é um derivado do monoterpene fenólico natural *p*-cimeno e um isômero do carvacrol (NABAVI et al., 2015; TRINDADE et al., 2018). Além disso, fatores abióticos, como luz, temperatura, sazonalidade, nutrição e disponibilidade de água, podem influenciar a atividade enzimática e, conseqüentemente, interferir na biossíntese de certos metabólitos secundários (DUARTE et al., 2010).

O óleo essencial de *C. flexuosos* é composto basicamente de monoterpenos, sendo o principal componente o citral, uma mistura dos isômeros geranial e neral. A atividade antimicrobiana do citral é conhecida desde a década de 1950 e parece exibir um amplo espectro antimicrobiano contra fungos e bactérias (THIELMANN; MURANYI, 2019). Nos estudos de Saddiq e Khayyat (2010), o citral exibiu boas atividades antifúngicas e antibacterianas contra *Penicillium italicum*, *Rizopusstolonifer* e *Staphylococcus aureus*.

Os principais compostos encontrados no óleo essencial de capim-limão foram geranial (42,69%), neral (33,53%) e geraniol (7,87%) (TABELA 4). Vários autores verificaram a presença de citral como composto majoritário desse óleo (CHOUDHARY et al., 2020; CHOWDHURY et al., 2010; DEVI et al., 2020; SHARMA et al., 2020; SILOU et al., 2019; THAKUR et al., 2020). O óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*, coletado em Kumaon (Uttarakhand) e isolado por hidrodestilação, apresentou como principais constituintes citral-a (33,1%), citral-b (30,0%), acetato de geranil (12,0%) e linalol (2,6%) (CHOWDHURY et al., 2010). Pandey et al. (2008) identificaram a presença de citral (43,80%), *z*-citral (18,93%), acetato de geranil (5,27%) e *trans*-geraniol (3,66%). Entretanto da Silva Gündel et al. (2018) constataram a presença de β -geraniol (45,74%), *z*-citral (34,42%) e geraniol (6,01%).

Tabela 4 - Percentagem dos componentes dos óleos essenciais *Cymbopogon flexuosus*.

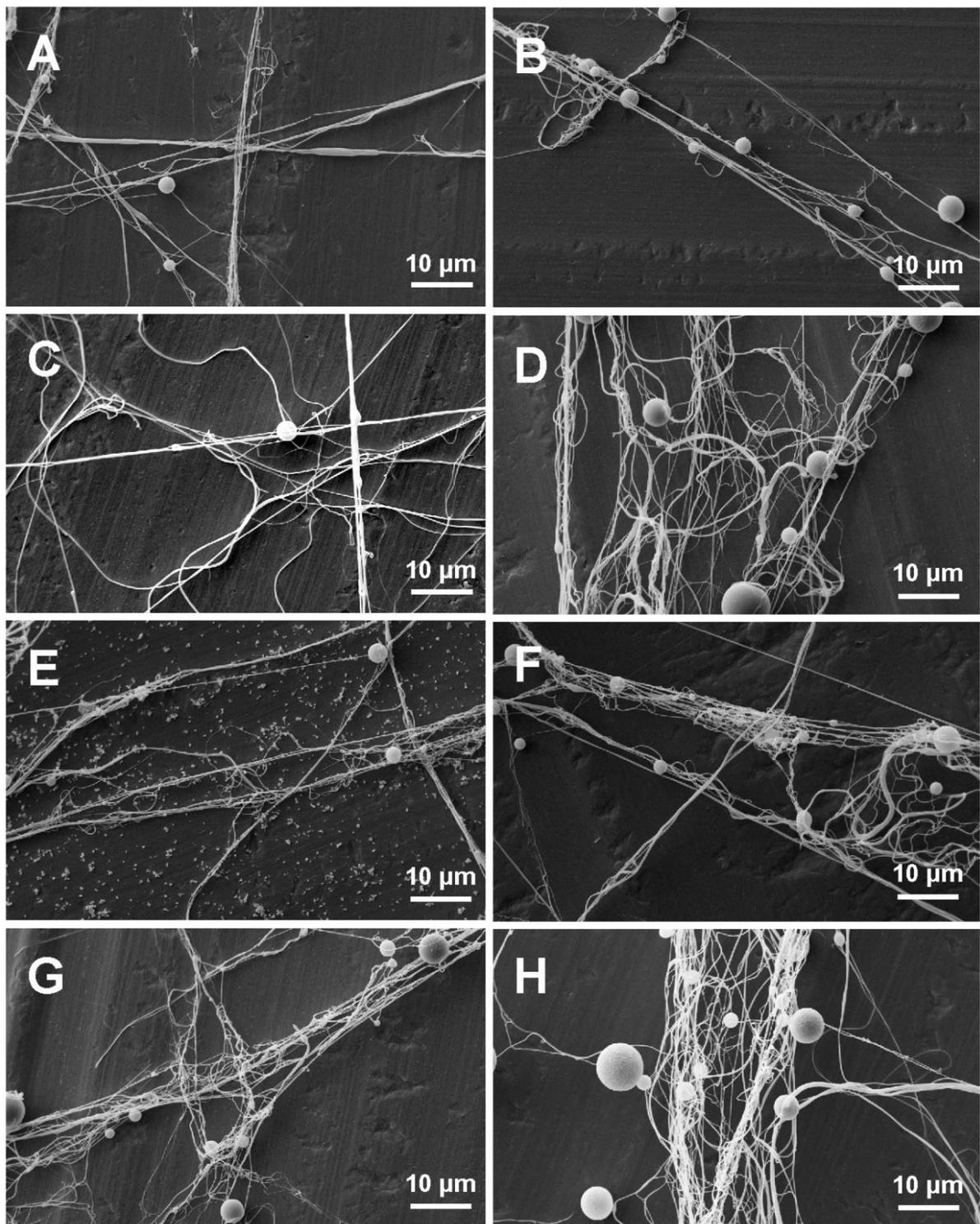
<i>Cymbopogon flexuosus</i>				
Nº	Compostos	IR	IR Lit.	% Área
1	α -pineno	932	932	0,18 \pm 0,00
2	Canfeno	946	946	0,93 \pm 0,01
3	6-metil-5-hepten-2-ona	985	981	0,79 \pm 0,00
4	Limoneno	1027	1024	2,87 \pm 0,01
5	β (Z)-ocimeno	1035	1032	0,16 \pm 0,00
6	Nonan-4-ona	1070	1073	0,73 \pm 0,00
7	Linalol	1100	1100	0,63 \pm 0,00
8	(Z)-isocitral	1163	1160	0,66 \pm 0,00
9	Isogeranial	1182	1183	0,81 \pm 0,00
10	Neral	1242	1242	33,53 \pm 0,02
11	Geraniol	1255	1255	7,87 \pm 0,02
12	Geranial	1272	1273	42,69 \pm 0,06
13	Acetato de geraniol	1385	1379	3,00 \pm 0,00
14	E-cariofileno	1416	1417	2,12 \pm 0,00
15	γ -cadineno	1512	1517	0,94 \pm 0,00
16	δ -cadineno	1522	1527	0,21 \pm 0,00

IR: índice de retenção; IR Lit: índice de retenção do composto de acordo com a literatura; % Área: percentagem do composto. Fonte: Do autor (2020).

4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

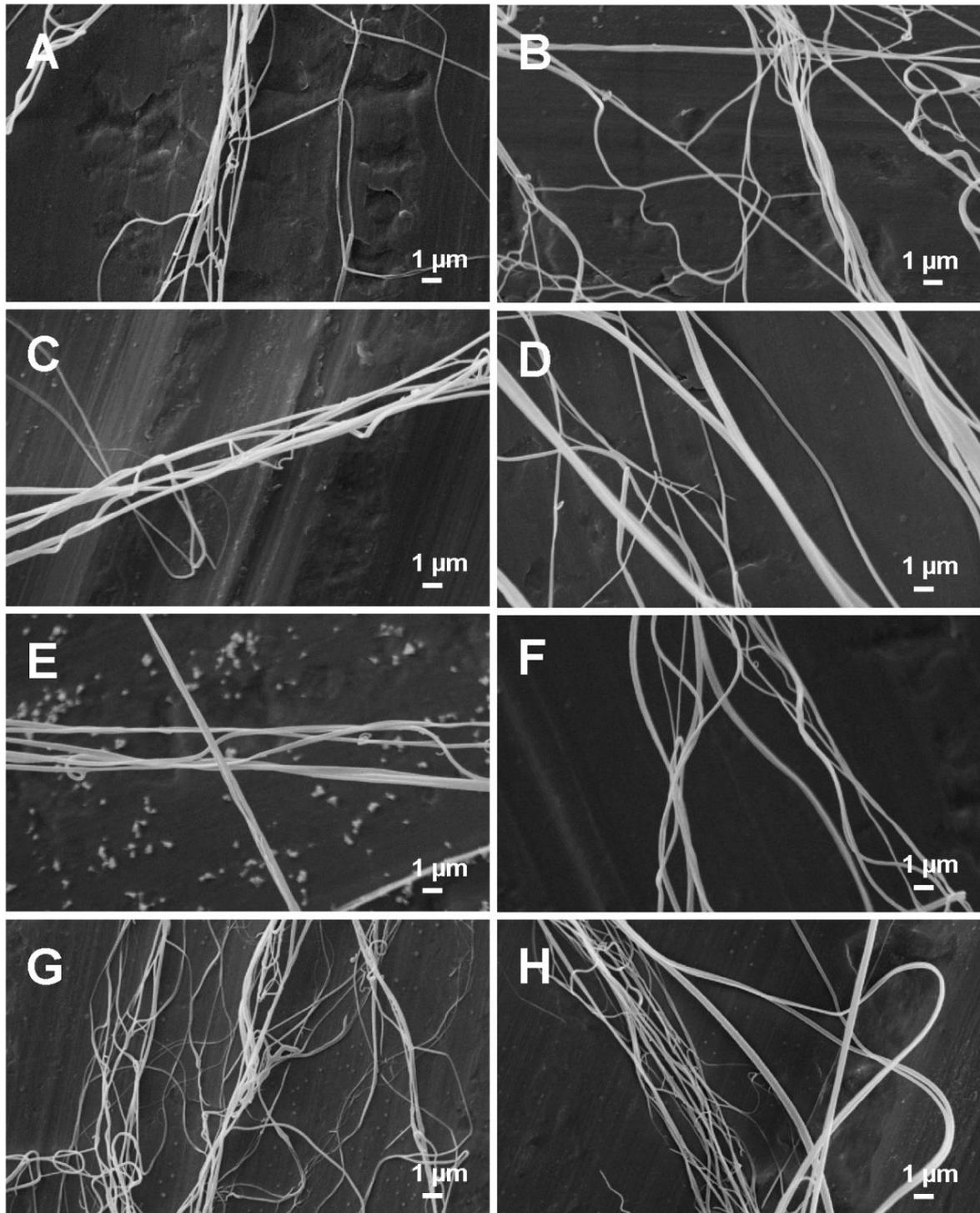
A análise de MEV possibilitou a caracterização da morfologia e do diâmetro das fibras produzidas pela fiação por sopro em solução, utilizando diferentes combinações dos óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão. As micrografias foram obtidas, em duas diferentes magnitudes, 3000 e 10000 x e estão apresentadas nas Figuras 5 e 6, respectivamente.

Figura 5 - Micrografias de MEV (3.000 x) das fibras de PLA obtidas por fiação por sopra em solução utilizando diferentes composições dos óleos essenciais.



Nanofibras de PLA pura (H) e contendo óleos essenciais de A: cravo-da-índia; B: tomilho; C: capim-limão; D: cravo-da-índia e tomilho; E: cravo-da-índia e capim-limão; F: capim-limão e tomilho; G: cravo-da-índia, tomilho e capim-limão. Fonte: Do autor (2020).

Figura 6 - Micrografias de MEV (10.000 x) das fibras de PLA obtidas por fiação por sopra em solução utilizando diferentes composições dos óleos essenciais.



Nanofibras de PLA pura (H) e contendo óleos essenciais de A: cravo-da-índia; B: tomilho; C: capim-limão; D: cravo-da-índia e tomilho; E: cravo-da-índia e capim-limão; F: capim-limão e tomilho; G: cravo-da-índia, tomilho e capim-limão. Fonte: Do autor (2020).

As medições dos diâmetros das fibras foram realizadas com o auxílio do software ImageJ e estão apresentados na Tabela 5. As gotas, os feixes de fibras e as regiões de interligação não foram considerados nas medidas.

Tabela 5 - Diâmetro médio das nanofibras de PLA incorporadas com óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão e suas combinações (conforme delineamento experimental).

Amostra	Média dos diâmetros (nm)	Desvio padrão
Capim-limão	177,27 a	± 78,85
Cravo-da-índia	151,10 b	± 83,89
Pura	137,07 c	± 71,63
Capim-limão e tomilho	136,81 c	± 74,84
Cravo-da-índia e tomilho	136,14 c	± 68,04
Tomilho	134,51 c	± 57,76
Cravo-da-índia, tomilho e capim-limão	126,96 d	± 65,39
Cravo-da-índia e capim-limão	119,50 d	± 66,50

As médias agrupadas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p \geq 0,05$). Fonte: Do autor (2020).

O diâmetro médio das nanofibras de PLA pura foi de 137,07 nm, sendo estatisticamente igual aos tratamentos, contendo óleo essencial de capim limão combinado com tomilho (136,81 nm), óleo essencial de cravo-da-índia, combinado com tomilho (136,14 nm) e apenas óleo essencial de tomilho (134,51 nm). As nanofibras de PLA, contendo óleo essencial de capim-limão, apresentaram o maior diâmetro médio (177,27 nm), seguido das nanofibras, contendo óleo essencial de cravo-da-índia (151,10), diferindo entre si e dos demais tratamentos. O menor diâmetro médio foi observado, nas nanofibras de PLA, contendo a combinação dos óleos essenciais de cravo-da-índia e capim-limão (119,50) e, nas nanofibras que continham os três óleos essenciais (cravo-da-índia, tomilho e capim-limão) combinados (126,96), não diferindo entre si.

As micrografias possibilitaram a observação de fibras em disposição aleatória e com diâmetros variados e a presença de esferas em todos os tratamentos. A morfologia e o diâmetro das nanofibras são fortemente influenciados por parâmetros, como a taxa de alimentação da solução polimérica, e as propriedades da solução, como concentração, viscosidade e tensão superficial (DEITZEL et al., 2001).

De acordo com Srinivasan et al. (2011), a morfologia da superfície pode variar de uma microestrutura corpuscular ou esférica a uma estrutura de contas na corda e, finalmente, a fibras agrupadas, ajustando a concentração da solução e o peso molecular do polímero.

A concentração de sobreposição (c^*) é outro parâmetro importante, para a morfologia das fibras e representa o ponto crítico, em que ocorre o emaranhamento significativo de polímero, de maneira que o jato de polímero se torne estável, superando as forças da inércia, levando à formação de fibras em vez de esferas. Quando a concentração do polímero em solução (c) é maior que a c^* , ocorre a formação de fibras; quando está próxima de c^* ($c \sim c^*$), formam-se contas em uma corda e, quando está abaixo de c^* ($c < c^*$), ocorre a formação de microestruturas corpusculares (BEHRENS et al., 2014).

Zong et al. (2002) demonstraram, em seus estudos, que a morfologia das fibras está relacionada com a taxa de alimentação e a concentração da solução. Em menores taxas de alimentação, menores foram as fibras do tipo fuso e, em maiores taxas de alimentação, observou-se a presença de esferas e fibras de maiores diâmetros. Além disso, maiores concentrações da solução reduziram a formação de esferas formando fibras mais uniformes. Segundo o autor, tanto as altas taxas de alimentação quanto a baixa concentração da solução fazem com que as fibras atinjam o coletor, sem que estejam completamente secas, resultando em contas ou junções. Porém a formação de contas não é necessariamente um problema negativo, para a incorporação de agentes ativos, pois podem atuar como depósitos adicionais e contribuir para a cinética de liberação dessas substâncias (HELLMANN et al., 2011).

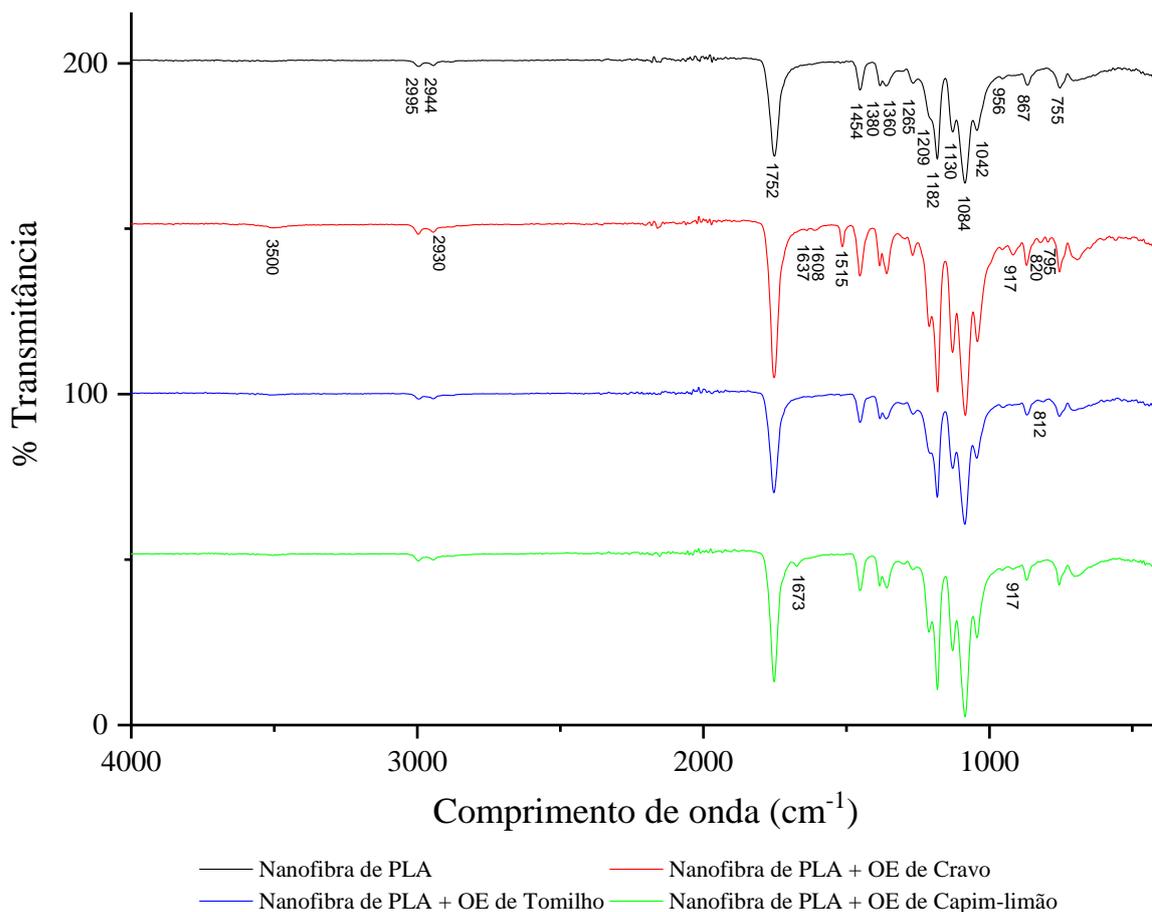
4.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

As análises de FTIR foram realizadas com a finalidade de avaliar a presença de grupos funcionais dos compostos orgânicos, contidos nas mantas de poli (ácido lático) e sua interação com os diferentes óleos utilizados, na produção das fibras, bem como avaliar a incorporação dos óleos essenciais na matriz polimérica.

O espectro do PLA puro (FIGURA 7) revelou a presença de bandas características de PLA, conforme mencionado na literatura. As bandas a 2995 e 2944 cm^{-1} referem-se ao alongamento assimétrico e simétrico C-H, respectivamente. O alongamento da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) do grupo éster é observado, como uma banda intensa a 1752 cm^{-1} e a flexão do grupo $\text{C}=\text{O}$ é observado em 1265 cm^{-1} . As bandas a 1182, 1130, 1084 e 1042 cm^{-1} são atribuídas ao alongamento C-O. As frequências de deformação simétrica do grupo -CH_3 foram identificadas a 1380 e 1360 cm^{-1} e a deformação assimétrica do grupo -CH_3 foi identificada a 1454 cm^{-1} . A banda a 755 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-C da fase cristalina, enquanto a banda a 867 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-C da fase amorfa do polímero. As bandas

observadas se assemelham em intensidade, forma e posição no espectro com os estudos relatados por diversos autores (AHMED et al., 2016; CHIENG et al., 2013; FU et al., 2018; GRANADOS-HERNANDEZ et al., 2018; IGLESIAS MONTES et al., 2019; JOHARI et al., 2016; MARRA et al., 2017; QIN et al., 2017; YOUNES; COHN, 1988).

Figura 7 - Espectro de FTIR das nanofibras de PLA incorporadas com óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão.



Fonte: Do autor (2020).

Além disso, todos os espectros de FTIR de misturas de PLA / óleo essencial exibiram as bandas características dos materiais à base de PLA e, embora as bandas mais intensas observadas nas nanofibras incorporadas com óleo essencial tenham sido as do PLA, observaram-se bandas de menor intensidade características dos óleos essenciais.

As nanofibras, contendo óleo essencial de cravo-da-índia (FIGURA 7), apresentaram vibração de alongamento -OH e C-H a 3500 cm^{-1} e 2930 cm^{-1} , respectivamente (AJITHA et al., 2019; MULLA et al., 2017; SHAHABADI et al., 2019; WU et al., 2008; YADAV; BALASUBRAMANIAN, 2015). O alongamento C=C do anel aromático foi observado em

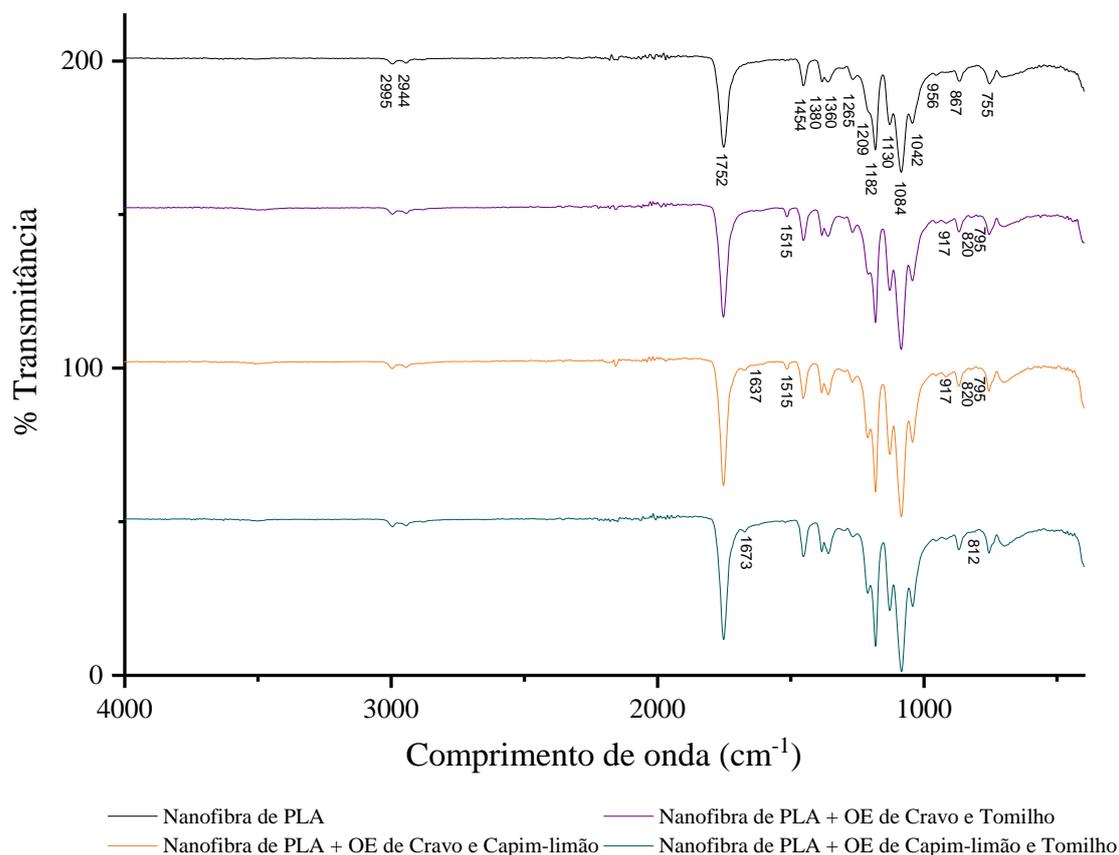
1637, 1608 e 1515 cm^{-1} (HU et al., 2016; RODRIGUEZ et al., 2018; SHAHABADI et al., 2019; WU et al., 2008). As bandas a 917, 820 e 794 cm^{-1} são referentes à deformação fora do plano, vibração de flexão e alongamento do grupo C-H, respectivamente (GONZÁLEZ-RIVERA et al., 2016; WU et al., 2008; YADAV; BALASUBRAMANIAN, 2015). Essas bandas revelam a presença de Eugenol, o principal composto do óleo essencial de cravo-da-índia.

O óleo essencial de capim-limão, cujo composto majoritário é o citral, uma mistura dos isômeros geranial e neral, provocou um incremento nas bandas referentes às deformações do grupo C-H₃ e ao estiramento C=O, C-O e C-C, nas nanofibras de PLA (FIGURA 7), indicando a formação de novas ligações nesses locais. Uma nova banda a 917 cm^{-1} é decorrência da deformação fora do plano do grupo C-H. A banda intensa a 1673 cm^{-1} , referente à vibração C=C (cis-trans) confirma a presença de ligações conjugadas presentes no citral (MISHRA et al., 2018).

Nas mantas nanofibrosas, contendo óleo essencial de tomilho (FIGURA 7), foi observada apenas uma nova banda a 812 cm^{-1} , referente às vibrações de oscilação CH fora do plano, que são os sinais mais significativos usados, na distinção de diferentes tipos de substituições de anéis aromáticos, além disso, observou-se um incremento nas bandas 1084, 1126 e 1180 cm^{-1} referentes ao alongamento C-O.

Ao combinar os óleos de cravo-da-índia e tomilho, na produção das nanofibras de PLA (FIGURA 8), observou-se um incremento nas bandas 1039, 1087, 1130 e 1180 cm^{-1} , referentes ao alongamento C-O, que também foi observado nas nanofibras de PLA, contendo apenas óleo essencial de tomilho. Três bandas muito sutis foram observados a 917, 820 e 795 cm^{-1} , referentes à deformação fora do plano, vibração de flexão e alongamento do grupo C-H, respectivamente (GONZÁLEZ-RIVERA et al., 2016; WU et al., 2008; YADAV; BALASUBRAMANIAN, 2015) e outra nova banda foi identificada em 1515 cm^{-1} referente ao alongamento C=C do anel aromático, que também foi identificado nas nanofibras de PLA contendo apenas óleo essencial de cravo-da-índia.

Figura 8 - Espectro de FTIR das nanofibras de PLA incorporadas com as combinações duas a duas dos óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão.



Fonte: Do autor (2020).

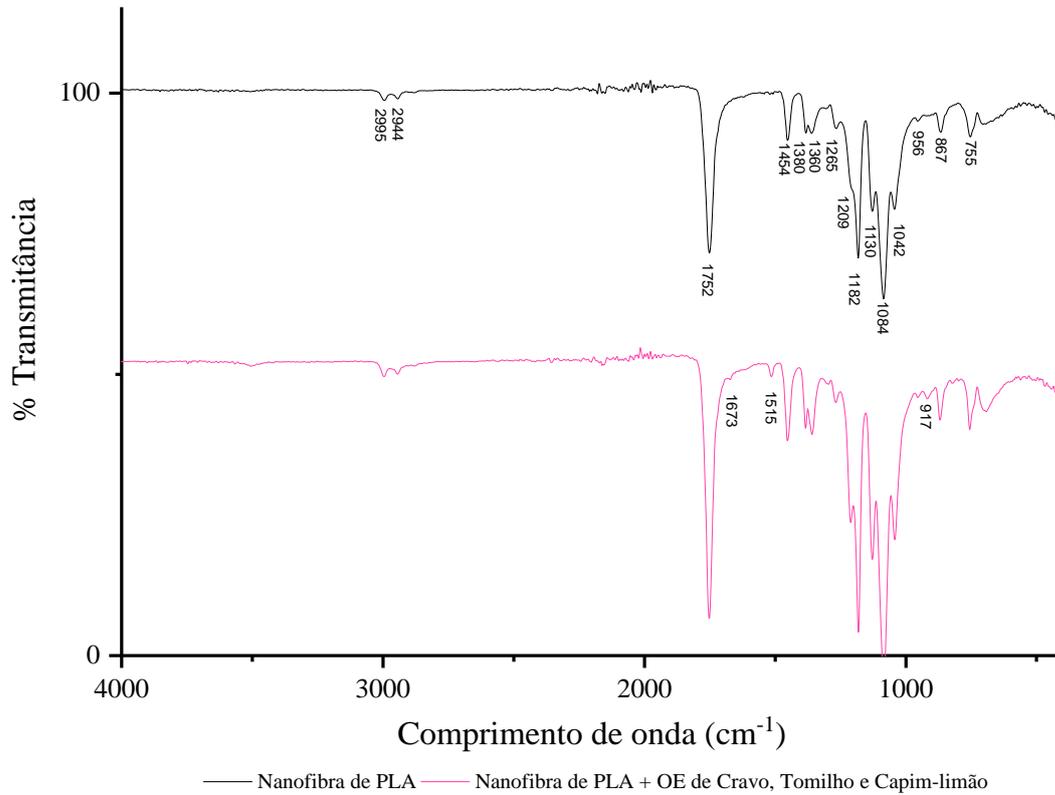
Nas nanofibras, contendo óleo essencial de cravo-da-índia, combinado com o óleo essencial de capim-limão (FIGURA 8), também foram observados as minúsculas bandas a 917, 820 e 795 cm^{-1} , além de um incremento nas bandas referentes às vibrações de deformação do grupo C-H₃ e ao estiramento C=O, C-O e C-C, acrescido de novas bandas em 1515 e 1673 cm^{-1} referentes ao alongamento C=C do anel aromático do eugenol e das ligações cis e trans do citral, confirmando a presença dos óleos essenciais de cravo-da-índia e capim-limão.

O espectro das nanofibras de PLA, contendo a combinação dos óleos essenciais de tomilho e capim-limão (FIGURA 8), apresentou bandas sutis a 812 e 1673 cm^{-1} decorrentes da deformação fora do plano do grupo C-H e da ligação de alongamento C=C (cis-trans) presente no citral. Além disso, ocorreu um incremento nas bandas referentes às vibrações de estiramento C=O e C-O.

Ao combinar os três óleos essenciais (cravo-da-índia, tomilho e capim-limão) (FIGURA 9), para a produção das nanofibras, observaram-se bandas a 917, 1515 e 1673 cm^{-1}

¹, além de um incremento nas bandas referentes às vibrações de deformação do grupo C-H₃ e ao estiramento C=O, C-O e C-C.

Figura 9 - Espectro de FTIR das nanofibras de PLA incorporadas com a combinação dos três óleos essenciais (cravo-da-índia, tomilho e capim-limão).

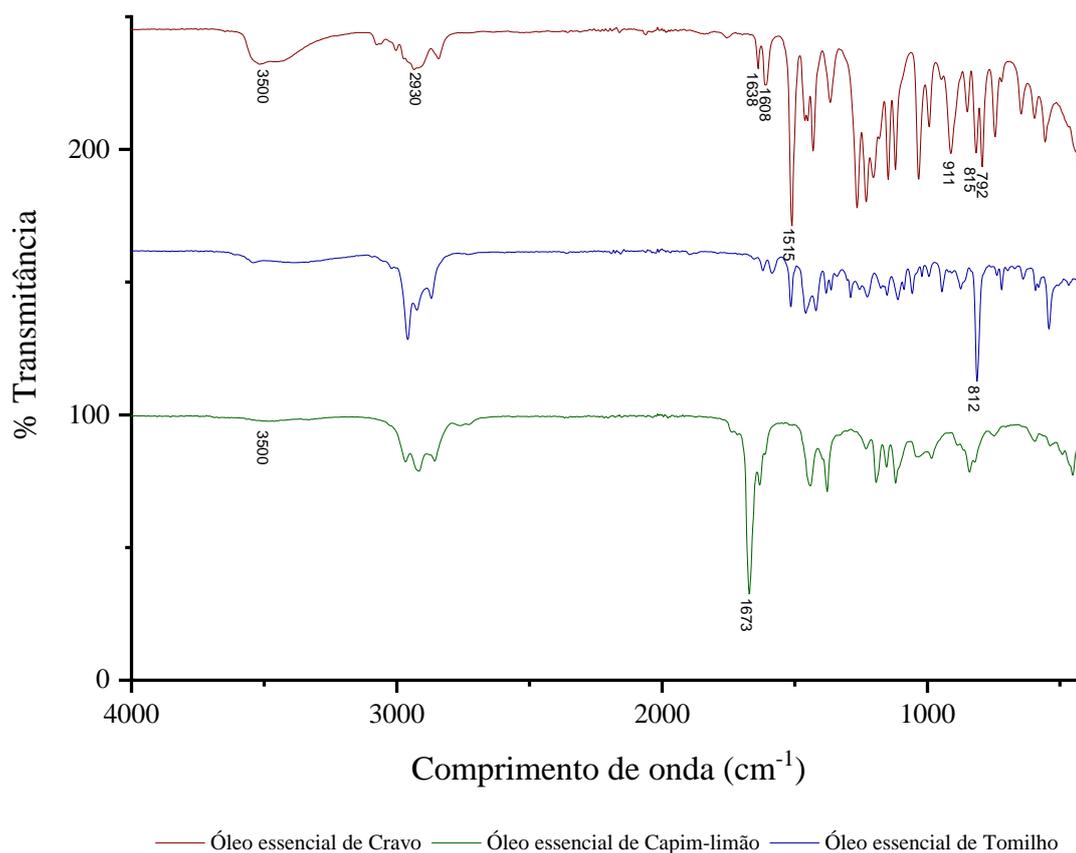


Fonte:

Do autor (2020).

A presença dessas novas bandas, nas mantas poliméricas e o incremento de bandas presentes no PLA, em regiões espectrais características de cada óleo essencial (FIGURA 10), confirmam a presença de óleos essenciais em todas as nanofibras analisadas.

Figura 10 - Espectro de FTIR dos óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão.

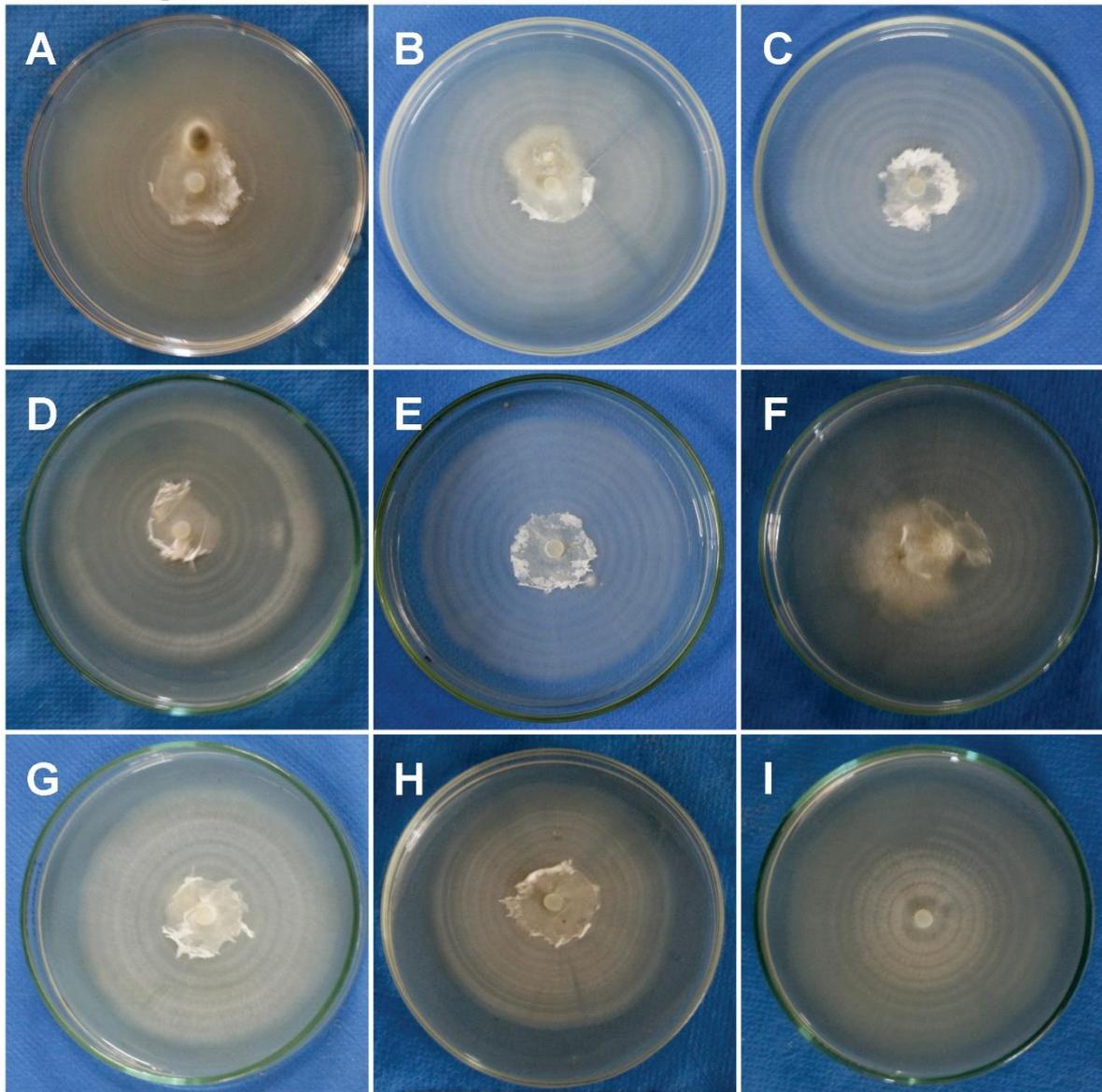


Fonte: Do autor (2020).

4.6 Experimento *in vitro*

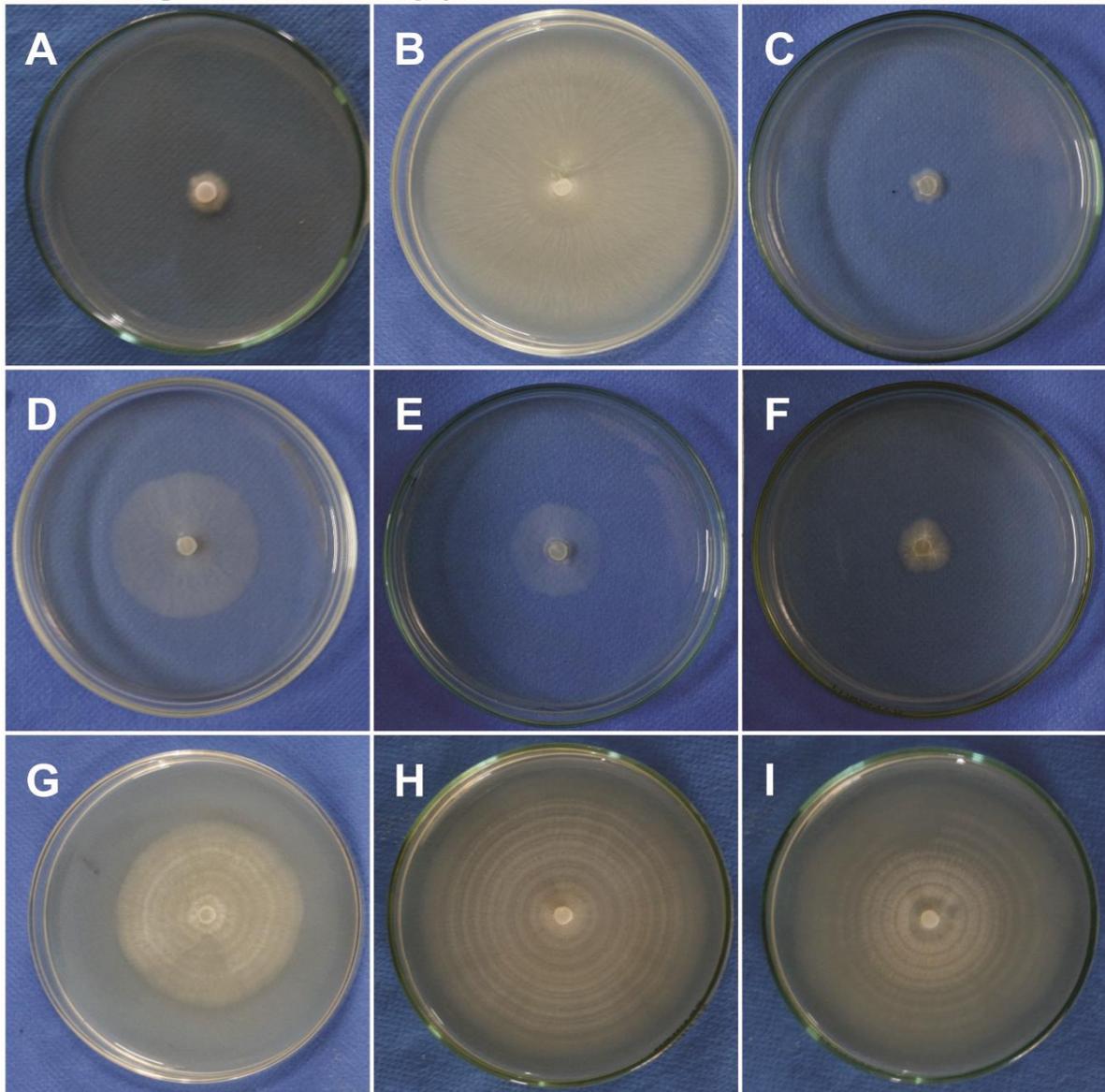
A porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum in vitro* (TABELA 6) variou de 1,42 a 7,76% pelo método de contato (FIGURA 11) e de 0,89 a 71,97% pelo método de fumigação (FIGURA 12). O teste F da análise de variância foi aplicado para verificar a interação entre os métodos e as formulações. Como essa interação não foi significativa, analisaram-se os efeitos principais e somente os Métodos foram significativos indicando, pelo teste F a 5% de significância, que há diferença entre o Método de Fumigação ($47,50 \pm 26,82$) e o Método de Contato ($3,91 \pm 4,65$), quando analisada a inibição do crescimento micelial.

Figura 11 - Inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum* por nanofibras incorporadas com óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão, pelo método de contato.



A: Óleo essencial de cravo-da-índia; B: Óleo essencial de tomilho; C: Óleo essencial de capim-limão; D: Óleo essencial de cravo-da-índia e tomilho, E: Óleo essencial de cravo-da-índia e capim-limão; F: Óleo essencial de tomilho e capim-limão; G: Óleo essencial de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão; H: Nanofibra sem óleo essencial; I: Controle (sem nanofibras). Fonte: Do autor (2020).

Figura 12 - Inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum* por nanofibras incorporadas com óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e capim limão pelo método de fumigação.



A: Óleo essencial de cravo-da-índia; B: Óleo essencial de tomilho; C: Óleo essencial de capim-limão; D: Óleo essencial de cravo-da-índia e tomilho, E: Óleo essencial de cravo-da-índia e capim-limão; F: Óleo essencial de tomilho e capim-limão; G: Óleo essencial de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão; H: Nanofibra sem óleo essencial; I: Controle (sem nanofibras). Fonte: Do autor (2020).

Tabela 6 - Médias seguidas de desvio-padrão da porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum* por nanofibras incorporadas com óleo essencial de cravo-da-índia, tomilho e capim limão.

Tratamento	Inibição do crescimento micelial (%)					
	Método de contato			Método de fumigação		
	Observado		Predito	Observado		Predito
1	5,44	± 6,55	5,43	71,97	± 8,21	71,97
2	3,73	± 3,76	3,72	0,89	± 4,33	0,88
3	5,99	± 2,94	5,98	67,57	± 14,78	67,57
4	1,52	± 2,72	1,54	37,52	± 5,0	37,52
5	7,76	± 4,88	7,78	54,17	± 13,70	54,17
6	1,42	± 1,77	1,44	62,51	± 15,15	62,51
7	4,95	± 2,32	3,10	30,58	± 4,96	44,28
8	2,03	± 1,61	3,10	61,47	± 4,56	44,28
9	2,37	± 1,93	3,10	40,80	± 4,53	44,28

1: Óleo essencial de cravo-da-índia; 2: Óleo essencial de tomilho; 3: Óleo essencial de capim-limão; 4: Óleos essenciais de cravo-da-índia e tomilho; 5: Óleos essenciais de cravo-da-índia e capim-limão; 6: Óleos essenciais de tomilho e capim-limão; 7, 8 e 9: Óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão. Fonte: Do autor (2020).

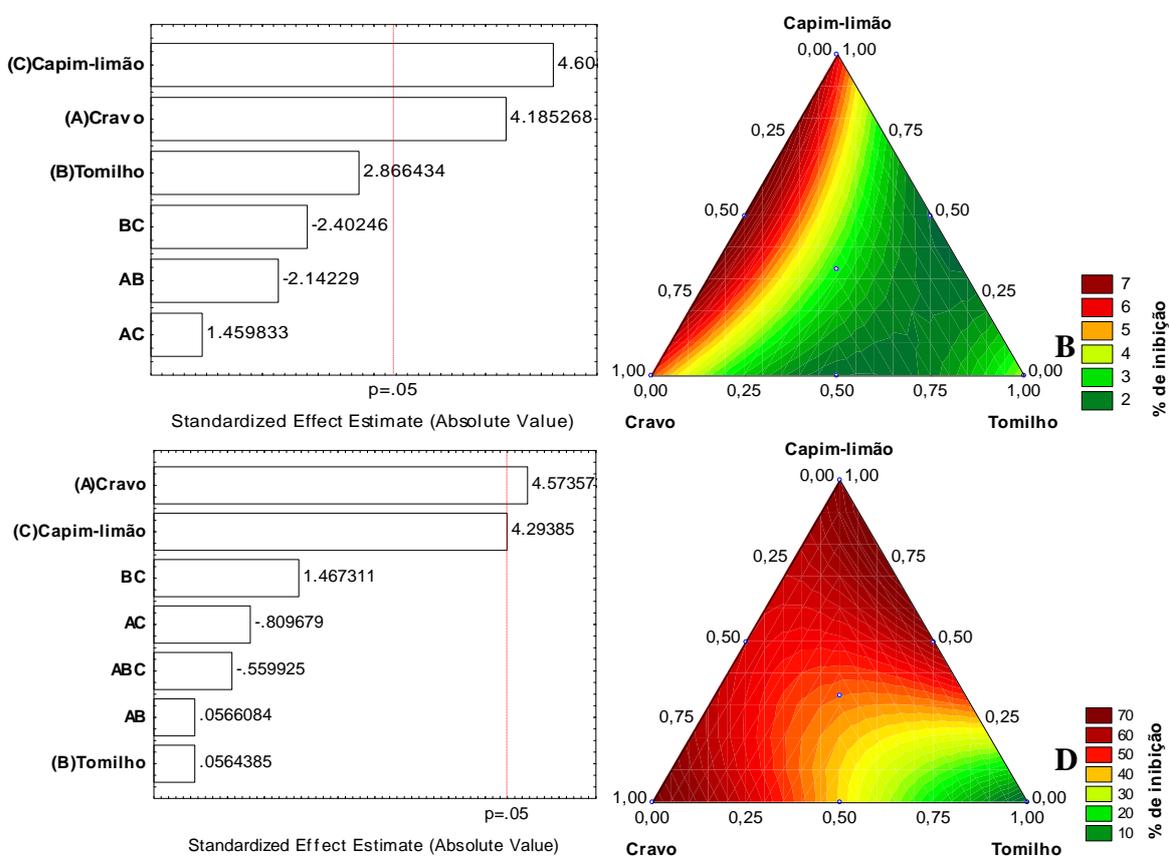
Portanto, no método de contato, nenhum dos tratamentos foi eficiente à inibição do crescimento micelial, possivelmente, pelo fato de o PLA ser relativamente hidrofóbico, com um ângulo de contato com a água de aproximadamente 80°. Essa característica hidrofóbica do material polimérico, aliada ao caráter hidrofóbico dos óleos essenciais, pode ter contribuído para uma redução da difusão dos agentes bioativos que se encontram encapsulados nas mantas de PLA para o meio de cultivo. A hidrofobicidade é uma propriedade importante, pois a molhabilidade afeta a interação das células com os materiais que estão em contato (BARAN; ERBIL, 2019; TONGNUANCHAN et al., 2013). Portanto todos esses fatores podem dificultar a interação das fibras com o patógeno.

Na análise de variância (ANOVA), os parâmetros de regressão do modelo polinomial quadrático e o especial cúbico foram estatisticamente significativos em um nível de confiança de 95%, sendo esses os modelos que mais se ajustaram aos métodos de contato e de fumigação, respectivamente. Os coeficientes de determinação (R^2) da inibição do crescimento micelial pelos métodos de contato e fumigação foram de 0.8733 e 0.8783, respectivamente. Portanto mostra-se que, aproximadamente, 87% dos resultados de ambas as metodologias utilizadas podem ser explicados pelos modelos experimentais aplicados.

Os gráficos de Pareto (FIGURA 13) mostram a influência de cada parâmetro e suas interações no desenho da mistura, as quais podem ser observadas em ordem decrescente de significância dos efeitos. Assim, observa-se que o tratamento com maior concentração do óleo essencial de cravo-da-índia apresentou o maior percentual de inibição para a

metodologia de fumigação. No método de contato, as nanofibras, contendo óleos essenciais de cravo-da-índia e de capim-limão, apresentaram os melhores resultados. De acordo com (HALL; FERNANDEZ, 2004), entre 14 óleos essenciais, o óleo da folha de cravo-da-índia produziu a maior zona de inibição contra *Penicillium digitatum*. Além disso, ao avaliar as interações entre os ingredientes, nota-se que, em ambos os métodos, as interações entre os óleos de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão não foram significativas em nível de confiança de 95%, confirmando os resultados obtidos na Tabela 6.

Figura 13 - Diagramas de Pareto demonstrando a influência das nanofibras incorporadas com óleo essencial sobre a inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum* pelos métodos de Contato (a) e Fumigação (c). Gráficos de superfície de contorno, para a otimização da inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum*, em função das variáveis independentes, óleos essenciais de cravo, tomilho e capim-limão pelos métodos de Contato (b) e Fumigação (d).



Fonte: Do autor (2020).

Um modelo polinomial quadrático foi obtido, de acordo com a Equação 2, para a metodologia de contato, e um modelo polinomial cúbico foi obtido, de acordo com a Equação 3, para a metodologia de fumigação, por meio da análise de regressão:

$$x = 5,43 A + 3,72 B + 5,98C - 12,16AB + 8,28AC - 13,63BC \quad (3)$$

$$x = 71,97A + 0,89B + 67,57C + 4,36AB - 62,42AC + 113,12BC - 233,46ABC \quad (4)$$

Em que x = porcentagem de inibição, A = óleo essencial de cravo-da-índia, B = óleo essencial de tomilho e C = óleo essencial de capim-limão.

Baseado no modelo matemático contido, nas Equações 2 e 3, foi gerada a Figura 15 (b) e (d), respectivamente, as quais representam os gráficos da superfície de resposta, em função das concentrações dos ingredientes variáveis e suas interações, quanto à inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum*.

De acordo com a Figura 15, a região ótima corresponde às melhores concentrações dos ingredientes variáveis para a obtenção da maior porcentagem de inibição do crescimento micelial. No método de fumigação, a região ótima corresponde a 100% de óleo essencial de cravo-da-índia Figura 15 (d). No método de contato, a região ótima corresponde a 46% de óleo de cravo-da-índia e a 54% do óleo de capim-limão. Nessas condições, as respostas previstas (TABELA 6), para a Figura 15 (d), foi de 72,9% e, para a Figura 15 (b), foi de 7,79% de inibição.

5 CONCLUSÃO

As nanofibras de PLA, contendo diferentes combinações dos óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão, foram produzidas com sucesso. A cromatografia gasosa (EM-DIC) possibilitou a identificação dos compostos químicos presentes nos óleos essenciais. Os principais compostos dos óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão foram eugenol (83,79%); p-cimeno (46,98%) e timol (18,23%); geranial (42,69%) e neral (33,53%), respectivamente. As análises de FTIR de todas as nanofibras revelaram bandas característicos do PLA e, nas nanofibras contendo óleo essencial, revelaram a presença de bandas característicos de cada óleo, estando de acordo com as análises cromatográficas. As micrografias propiciaram a observação de fibras, em disposição aleatória e com diâmetros variados e a presença de esferas em todos os tratamentos. Por meio do delineamento centroide-simplex, observou-se que as nanofibras aplicadas pelo método de fumigação apresentaram melhores resultados e, dentre elas, a nanofibra, contendo óleo essencial de cravo-da-índia, foi a mais eficaz, apresentando 71,79% de inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum*. A superfície de resposta e a equação do modelo estatístico cúbico especial indicaram a formulação com 100% de OE de cravo-da-índia como a formulação ótima para o controle *in vitro* de *Penicillium digitatum*. Esses resultados confirmam o potencial das nanofibras SBS incorporadas com óleo essencial para o controle *in vitro* de *Penicillium digitatum*.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, A. et al. Evaluation of essential oils for maintaining postharvest quality of Thompson seedless table grape. **Natural Product Research**, v.26, n. 1, p. 77-83, 2012.
- ABDOLLAHI, A. et al. Screening of antifungal properties of essential oils extracted from sweet basil, fennel, summer savory and thyme against postharvest phytopathogenic fungi. **Journal of Food Safety**, v.31, n. 3, p. 350-356, 2011.
- ABDULAZEEZ, M. A. et al. Chapter 58 - Lemongrass (*Cymbopogon spp.*) oils. In: PREEDY, V. R. **Essential oils in food preservation, flavor and safety**. San Diego: Ed. Academic Press, 2016. p. 509-516.
- ADAMS, P. R. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Gruver, TX USA: 2017.
- AHMED, J. et al. Antimicrobial, rheological, and thermal properties of plasticized polylactide films incorporated with essential oils to inhibit *Staphylococcus aureus* and *Campylobacter jejuni*. **J Food Sci**, v.81, n. 2, p. E419-429, Feb 2016.
- AJITHA, B. et al. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles using *Syzygium aromaticum* (clove) extract: Catalytic and antimicrobial effects. **Applied Organometallic Chemistry**, v.33, n. 5, 2019.
- ALAWIYAH, A. L. et al. Antioxidant activity of volatile compounds from *Syzygium aromaticum* (L.) leaves. **Journal of Physics: Conference Series**, v.1402, 2019.
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. 2 ed. Viçosa: Ed. UFV, 2007.
- ALLAHVAISI, S. et al. Contact toxicity of poly lactic acid nanofibers loaded with two essential oils against *Plodia interpunctella* Hub. (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Biopesticides**, v.10, n. 1, p. 50-59, 2017.
- ALTAN, A. et al. Carvacrol loaded electrospun fibrous films from zein and poly(lactic acid) for active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v.81, p. 48-59, 2018.
- AMORIM, L. et al. **Manual de fitopatologia**. 5 ed. Ouro Fino: Ed. Agronômica Ceres, 2018.
- ANTONIOLI, G. et al. Poly(lactic acid) nanocapsules containing lemongrass essential oil for postharvest decay control: In vitro and in vivo evaluation against phytopathogenic fungi. **Food Chemistry**, v.326, 2020.
- AURAS, R. et al. **Poly(lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and applications**. New Jersey: Ed. Wiley, 2010.
- AZIZI, M. et al. Inhibitory effect of some medicinal plants' essential oils on postharvest fungal disease of citrus fruits. **Acta Horticulturae**, v.768, p. 279-286, 05/01 2008.
- BARAN, E.; ERBIL, H. Surface modification of 3D printed PLA objects by fused deposition modeling: a review. **Colloids and Interfaces**, v.3, n. 2, 2019.
- BARHOUM, A. et al. Nanofibers as new-generation materials: from spinning and nano-spinning fabrication techniques to emerging applications. **Applied Materials Today**, v.17, p. 1-35, 2019/12/01/ 2019.

- BAZIOLI, J. M. et al. Biological control of citrus postharvest phytopathogens. **Toxins**, v.11, n. 8, 2019.
- BEHRENS, A. M. et al. In situ deposition of PLGA nanofibers via solution blow spinning. **ACS Macro Letters**, v.3, n. 3, p. 249-254, 2014.
- BONAN, R. F. et al. In vitro antimicrobial activity of solution blow spun poly(lactic acid)/polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with Copaiba (*Copaifera sp.*) oil. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v.48, p. 372-377, Mar 2015.
- BOSQUEZ-MOLINA, E. et al. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. **Postharvest Biology and Technology**, v.57, n. 2, p. 132-137, 2010.
- BUZEA, C. et al. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. **Biointerphases**, v.2, n. 4, p. MR17-71, Dec 2007.
- CENGİZ ÇALLIOĞLU, F. et al. Emulsion electrospinning of bicomponent poly (vinyl pyrrolidone)/gelatin nanofibers with thyme essential oil. **Materials Research Express**, v.6, n. 12, 2019.
- CHAUDHARI, A. K. 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 Int**, v.26, n. 25, p. 25414-25431, Sep 2019.
- CHEN, J. et al. Inhibition of key citrus postharvest fungal strains by plant extracts in vitro and in vivo: A review. **Plants**, v.8, n. 2, 2019.
- CHIENG, B. et al. Poly(lactic acid)/poly(ethylene glycol) polymer nanocomposites: effects of graphene nanoplatelets. **Polymers**, v.6, n. 1, p. 93-104, 2013.
- CHOUDHARY, S. et al. Effects of boron toxicity on growth, oxidative damage, antioxidant enzymes and essential oil fingerprinting in *Mentha arvensis* and *Cymbopogon flexuosus*. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v.7, n. 1, 2020.
- CHOWDHURY, S. R. et al. Chemical composition of the essential oil of *Cymbopogon flexuosus* (steud) wats. growing in kumaon region. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v.13, n. 5, p. 588-593, 2010.
- COSTA, J. H. et al. *Penicillium digitatum* infection mechanisms in citrus: What do we know so far? **Fungal Biology**, v.123, n. 8, p. 584-593, 2019.
- DA SILVA GÜNDEL, S. et al. Nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil: Development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. **Microbial Pathogenesis**, v.118, p. 268-276, 2018.
- DANIEL, C. K. et al. In vivo application of garlic extracts in combination with clove oil to prevent postharvest decay caused by *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Neofabraea alba* on apples. **Postharvest Biology and Technology**, v.99, p. 88-92, 2015.
- 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, 2016/12/28 2016.

- DE LA RAMA, E. M. et al. Synthesis, characterization, fabrication and application of electrospun nanofiber polymer composite: a potential bio-material for black mold rot (*Aspergillus niger*) of onions (*Allium cepa* L.). **Journal of Physics: Conference Series**, v.1310, 2019.
- DEITZEL, J. M. et al. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. **Polymer**, v.42, n. 1, p. 261-272, 2001/01/01/ 2001.
- DEVI, M. A. et al. Toxicity, repellency and chemical composition of essential oils from *Cymbopogon* species against red flour beetle *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v.15, n. 2, p. 181-191, 2020.
- DIAS, G. C. et al. PVDF nanofibers obtained by solution blow spinning with use of a commercial airbrush. **Journal of Polymer Research**, v.26, n. 4, p. 87, 2019/03/11 2019.
- DUARTE, A. R. et al. Genetic and environmental influence on essential oil composition of *Eugenia dysenterica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, p. 1459-1467, 2010.
- EL-GALI, Z. I. Antifungal activity of essential oils from some medicinal plants against green mold (*Penicillium digitatum*). **International Journal of Advanced Research in Botany**, v.4, n. 2, 2018.
- ELSHAFIE, H. S. et al. In vivo antifungal activity of two essential oils from Mediterranean plants against postharvest brown rot disease of peach fruit. **Industrial Crops and Products**, v.66, p. 11-15, 2015.
- FANG, J. et al. Applications of electrospun nanofibers. **Science Bulletin**, v.53, n. 15, p. 2265-2286, 2008.
- FARAH, S. et al. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications - A comprehensive review. **Adv Drug Deliv Rev**, v.107, p. 367-392, Dec 15 2016.
- FARIAS, P. K. S. et al. Antioxidant activity of essential oils from condiment plants and their effect on lactic cultures and pathogenic bacteria. **Ciencia Rural**, v.49, n. 2, 2019.
- FATEMI, S. et al. Effect of essential oils of thymus vulgaris and mentha piperita on the control of green mould and postharvest quality of citrus sinensis cv. Valencia. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n. 66, p. 14932-14936, 2011.
- FIGUEROA-LOPEZ, K. J. et al. Antimicrobial and antioxidant performance of various essential oils and natural extracts and their incorporation into biowaste derived poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) layers made from electrospun ultrathin fibers. **Nanomaterials (Basel)**, v.9, n. 2, Jan 23 2019.
- FRANCO-VEGA, A. et al. Sweet orange (*Citrus sinensis*) oils. In: **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**, 2016. p. 783-790.
- FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, v.2004, n. 49, p. 1-173, 2004.
- FU, L. et al. Anisotropic shape memory behaviors of polylactic acid/citric acid–bentonite composite with a gradient filler concentration in thickness direction. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.57, n. 18, p. 6265-6274, 2018.

- GANJEWALA, D. *Cymbopogon* essential oils: chemical compositions and bioactivities. **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, v.3, n. 2-3, p. 56-65, 2009.
- GIUFFRÈ, A. M. et al. Vinegar production to valorise Citrus bergamia by-products. **European Food Research and Technology**, v.245, n. 3, p. 667-675, 2019/03/01 2019.
- GONZÁLEZ-RIVERA, J. et al. Coaxial microwave assisted hydrodistillation of essential oils from five different herbs (lavender, rosemary, sage, fennel seeds and clove buds): Chemical composition and thermal analysis. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.33, p. 308-318, 2016.
- GRANADOS-HERNANDEZ, M. V. et al. In vitro and in vivo biological characterization of poly(lactic acid) fiber scaffolds synthesized by air jet spinning. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v.106, n. 6, p. 2435-2446, Aug 2018.
- GRANDI, T. S. M. **Tratado das plantas medicinais: mineiras, nativas e cultivadas**. 1 ed. Belo Horizonte: Ed. Adaequatio Estúdio, 2014.
- GUERREIRO, A. C. et al. Edible coatings enriched with essential oils for extending the shelf-life of 'Bravo de Esmolfe' fresh-cut apples. **International Journal of Food Science and Technology**, v.51, n. 1, p. 87-95, 2016.
- GUPTA, A. K. et al. A study on antimicrobial activities of essential oils of different cultivars of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*). **Pharmaceutical Sciences**, v.22, n. 3, p. 164-169, 2016.
- HALL, D. J.; FERNANDEZ, Y. J. In vitro evaluation of selected essential oils as fungicides against *Penicillium digitatum* sacc. **Proc. Fla. State Hort. Soc.**, p. 377-379, 2004.
- HAMAD, A. et al. Chemical constituents and antimicrobial activities of essential oils of *Syzygium polyanthum* and *Syzygium aromaticum*. **Rasayan Journal of Chemistry**, v.10, p. 564-569, 04/01 2017.
- HASANPOUR ARDEKANI-ZADEH, A.; HOSSEINI, S. F. Electrospun essential oil-doped chitosan/poly(epsilon-caprolactone) hybrid nanofibrous mats for antimicrobial food biopackaging exploits. **Carbohydr Polym**, v.223, p. 115108, Nov 1 2019.
- HELLMANN, C. et al. Design of pheromone releasing nanofibers for plant protection. **Polymers for Advanced Technologies**, v.22, n. 4, p. 407-413, 2011.
- HEYDARIAN, M. et al. Effects of dietary inclusion of the encapsulated thyme and oregano essential oils mixture and probiotic on growth performance, immune response and intestinal morphology of broiler chickens. **Poultry Science Journal**, v.8, n. 1, p. 17-25, 2020.
- HU, Q. et al. Antimicrobial eugenol nanoemulsion prepared by gum arabic and lecithin and evaluation of drying technologies. **Int J Biol Macromol**, v.87, p. 130-140, Jun 2016.
- HUSSAIN, S. et al. Effect of different combinations of antibiotics on fruit quality and antioxidant defense system in Huanglongbing infected Kinnow orchards. **AMB Express**, v.9, n. 1, p. 147, 2019/09/14 2019.
- IGLESIAS MONTES, M. L. et al. Design and characterization of PLA bilayer films containing lignin and cellulose nanostructures in combination with umbelliferone as active ingredient. **Front Chem**, v.7, p. 157, 2019.

- INGLESE, P.; SORTINO, G. Citrus history, taxonomy, breeding, and fruit quality. **Research Paper - University of Oxford**, 02/28 2019.
- ISEPPI, R. et al. Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus vulgaris* L. essential oils and their combination against food-borne pathogens and spoilage bacteria in ready-to-eat vegetables. **Natural Product Research**, v.33, n. 24, p. 3568-3572, 2019.
- JIANU, C. et al. Composition and antioxidant capacity of essential oils obtained from *Thymus vulgaris*, *Thymus pannonicus* and *Satureja Montana* grown in Western Romania. v.66, p. 2157-2160, 01/01 2015.
- JIROVETZ, L. et al. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n. 17, p. 6303-6307, 2006/08/01 2006.
- JOHARI, A. P. et al. Influence of different treated cellulose fibers on the mechanical and thermal properties of poly(lactic acid). **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v.4, n. 3, p. 1619-1629, 2016.
- KAMATOU, G. P. et al. Eugenol-from the remote Maluku islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v.17, p. 6953-6981, 12/01 2012.
- KAZEMI, M. Phytochemical composition of *Thymus vulgaris* L. essential oil. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v.18, n. 3, p. 751-753, 2015.
- KESICI GÜLER, H. et al. Antibacterial PVP/cinnamon essential oil nanofibers by emulsion electrospinning. **The Journal of The Textile Institute**, v.110, n. 2, p. 302-310, 2018.
- KFOURY, M. et al. Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon essential oils with cyclodextrins. **Carbohydrate Polymers**, v.118, p. 156-164, Mar 2015.
- KIM, J. E. et al. Fumigant antifungal activity via reactive oxygen species of *Thymus vulgaris* and *Satureja hortensis* essential oils and constituents against *Raffaelea quercus-mongolicae* and *Rhizoctonia solani*. **Biomolecules**, v.9, n. 10, 2019.
- KLOUCEK, P. et al. Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. **Food Research International**, v.47, n. 2, p. 161-165, 2012.
- LARANJEIRA, F. F. et al. Fungos, procariotos e doenças abióticas. *In: Citros*: Ed. Instituto Agronômico/Fundag, 2005.
- LEE, J. Y. et al. Fabrication of antibacterial nanofibrous membrane infused with essential oil extracted from tea tree for packaging applications. **Polymers (Basel)**, v.12, n. 1, Jan 5 2020.
- LI, X. et al. Effects of the peptide H-OOWW-NH₂ and its derived lipopeptide C12-OOWW-NH₂ on controlling of citrus postharvest green mold. **Postharvest Biology and Technology**, v.158, p. 110979, 2019/12/01/ 2019.
- LIN, L. et al. Electrospun thyme essential oil/gelatin nanofibers for active packaging against *Campylobacter jejuni* in chicken. **LWT**, v.97, p. 711-718, 2018.
- LIU, F. et al. Antimicrobial carvacrol in solution blow-spun fish-skin gelatin nanofibers. **J Food Sci**, v.83, n. 4, p. 984-991, Apr 2018.

- LIU, S. et al. Solidago canadensis L. essential oil vapor effectively inhibits botrytis cinerea growth and preserves postharvest quality of strawberry as a food model system. **Frontiers in Microbiology**, v.7, n. AUG, 2016.
- LIU, Y. et al. History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.11, n. 6, p. 530-545, 2012.
- LIU, Y. et al. Development of poly(lactic acid)/chitosan fibers loaded with essential oil for antimicrobial applications. **Nanomaterials (Basel)**, v.7, n. 7, Jul 24 2017.
- LORENZI, H. M., F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. 2 ed. Nova Edessa: Ed. Instituto Plantarum, 2008.
- MADHAVAN NAMPOOTHIRI, K. et al. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. **Bioresource Technology**, v.101, n. 22, p. 8493-8501, 2010/11/01/ 2010.
- MANDAL, S.; DEBMANDAL, M. Chapter 94 - Thyme (*Thymus vulgaris* L.) oils. In: PREEDY, V. R. **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. San Diego: Ed. Academic Press, 2016. p. 825-834.
- MARCHESE, A. et al. Update on monoterpenes as antimicrobial agents: a particular focus on p-cymene. **Materials (Basel)**, v.10, n. 8, Aug 15 2017a.
- MARCHESE, A. et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: a mechanistic viewpoint. **Crit Rev Microbiol**, v.43, n. 6, p. 668-689, Nov 2017b.
- MARRA, A. et al. Effect of TiO₂ and ZnO on PLA degradation in various media. **Advanced Material Science**, v.2, n. 2, 2017.
- MARTÍNEZ, J. A.; GONZÁLEZ, R. Essential oils from clove affect growth of *Penicillium* species obtained from lemons. **Communications in agricultural and applied biological sciences**, v.78, n. 3, p. 563-572, 2013.
- MATTOS, L. P. V. **Controle de *Guignardia citricarpa* e *Penicillium digitatum* em laranja com óleos essenciais e agentes de biocontrole**. 2010. 94 p. Tese (Doutorado em Agronomia)- Universidade Estadual Paulista, Botucatu. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/106632>. Acesso em: 13 jan. 2020.
- 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, 2009/08/15 2009.
- MEHRA, L. K. et al. Effect of postharvest biofumigation on fungal decay, sensory quality, and antioxidant levels of blueberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.85, p. 109-115, 2013.
- MEHRAN, M. et al. Microencapsulation of *Mentha spicata* essential oil by spray drying: Optimization, characterization, release kinetics of essential oil from microcapsules in food models. **Industrial Crops and Products**, v.154, 2020.
- MEMAR, M. Y. et al. Carvacrol and thymol: strong antimicrobial agents against resistant isolates. **Reviews in Medical Microbiology**, v.28, n. 2, p. 63-68, 2017.
- MIRANDA, K. W. E. et al. Polystyrene bioactive nanofibers using orange oil as an ecofriendly solvent. **Journal of Applied Polymer Science**, v.136, n. 15, 2019.

MISHRA, D. et al. Retention of antibacterial and antioxidant properties of lemongrass oil loaded on cellulose nanofibre-poly ethylene glycol composite. **Industrial Crops and Products**, v.114, p. 68-80, 2018.

MITTAL, M. et al. Phytochemical evaluation and pharmacological activity of *Syzygium aromaticum*: A comprehensive review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.6, p. 67-72, 01/01 2014.

MOOSAVI-NASAB, M. et al. The inhibitory potential of *Zataria multiflora* and *Syzygium aromaticum* essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in culture media and Iranian white cheese. **Food Science & Nutrition**, v.6, 12/15 2017.

MULLA, M. et al. Antimicrobial efficacy of clove essential oil infused into chemically modified LLDPE film for chicken meat packaging. **Food Control**, v.73, p. 663-671, 2017.

MUNHUWEYI, K. et al. Physical and antifungal properties of β -cyclodextrin microcapsules and nanofibre films containing cinnamon and oregano essential oils. **LWT**, v.87, p. 413-422, 2018.

NABAVI, S. M. et al. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: from farm to pharmacy. **Food Chem**, v.173, p. 339-347, Apr 15 2015.

NABIGOL, A.; MORSHEDI, H. Evaluation of the antifungal activity of the Iranian thyme essential oils on the postharvest pathogens of strawberry fruits. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n. 48, p. 9864-9869, 2011.

NARDONI, S. et al. In vitro activity of essential oils against *Saprolegnia parasitica*. **Molecules**, v.24, n. 7, 2019.

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, 2018.

NEVES, F. M.; TROMBIN, V. G. **Anuário da citricultura 2017**. 1 ed. São Paulo: Ed. CITRUSBR, 2017.

NEVES, F. M. et al. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Ed. Markestrat, 2011.

NIST. The NIST Mass Spectrometry Data Center. Gaithersburg, National Institute of Standards and Technology, 2008.

NUNES DA SILVA, S. et al. Advances and concerns about nanotechnology in foods humans and animals - a review. **Archivos de Zootecnia**, v.68, n. 264, p. 594-601, 2019.

PALOU, L. *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (green mold, blue mold). In: **Postharvest Decay: Control Strategies**, 2014. p. 45-102.

PALOU, L. et al. Antifungal edible coatings for fresh citrus fruit: A review. **Coatings**, v.5, n. 4, p. 962-986, 2015.

PANDEY, A. K. et al. Chemical composition and antimycotic activity of the essential oils of corn mint (*Mentha arvensis*) and lemon grass (*Cymbopogon flexuosus*) against human pathogenic fungi. **Pharmaceutical Biology**, v.41, n. 6, p. 421-425, 2008.

PAPOUTSIS, K. et al. Non-chemical treatments for preventing the postharvest fungal rotting of citrus caused by *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold). **Trends in Food Science and Technology**, v.86, p. 479-491, 2019.

PARIS, M. J. et al. Modelling release mechanisms of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil encapsulated in alginate beads during vapor-phase application. **Journal of Food Engineering**, v.282, 2020.

PEBERDY, J. F. **Penicillium and Acremonium**. 1 ed. Ed. Springer US, 1987.

PERUMAL, A. B. et al. Effects of Essential Oil Vapour Treatment on the Postharvest Disease Control and Different Defence Responses in Two Mango (*Mangifera indica* L.) Cultivars. **Food and Bioprocess Technology**, v.10, n. 6, p. 1131-1141, 2017.

PILAR SANTAMARINA, M. et al. Commercial *Laurus nobilis* L. and *Syzygium aromaticum* L. Merr. & Perry essential oils against post-harvest phytopathogenic fungi on rice. **LWT - Food Science and Technology**, v.65, p. 325-332, 2016/01/01/ 2016.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Penicillium* and related genera. In: **Fungi and Food Spoilage**, 2009. cap. Chapter 7, p. 169-273.

PLAZA, P. et al. Evaluation of the potential of commercial post-harvest application of essential oils to control citrus decay. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.79, n. 6, p. 935-940, 2004.

POLLETTINI, F. L. **Purificação da toxina Killer de *Aureobasidium pullulans* visando o biocontrole de *Penicillium digitatum* e *Geotrichum citri-aurantii***. 2019. 43 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária)- Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/180881>. Acesso em: 13 jan. 2020.

QIN, Y. et al. Development of active packaging film made from poly (lactic acid) incorporated essential oil. **Progress in Organic Coatings**, v.103, p. 76-82, 2017.

QUESADA, J. et al. Antimicrobial active packaging including chitosan films with *Thymus vulgaris* L. essential oil for ready-to-eat meat. **Foods**, v.5, n. 3, Aug 29 2016.

RADÜNZ, M. et al. Antimicrobial potential of spray drying encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil on the conservation of hamburger-like meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v.330, 2020.

RAFIQ, M. et al. Development of sodium alginate/PVA antibacterial nanofibers by the incorporation of essential oils. **Materials Research Express**, v.5, n. 3, 2018.

RODRIGUEZ, J. D. W. et al. Rapid quantification of clove (*Syzygium aromaticum*) and spearmint (*Mentha spicata*) essential oils encapsulated in a complex organic matrix using an ATR-FTIR spectroscopic method. **PLoS ONE**, v.13, n. 11, p. e0207401, 2018.

ROSA, D. P. **Resíduo de laranja: estudo da cinética de secagem das sementes e influência da temperatura na qualidade do óleo**. 2013. 127 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/90773>. Acesso em: 13 jan. 2020.

ROUSSOS, P. A. Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). In: **Nutritional Composition of Fruit Cultivars**, 2015. p. 469-496.

- SADDIQ, A. A.; KHAYYAT, S. A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.98, n. 1, p. 89-93, 2010.
- SALEHI, B. et al. Thymus spp. plants - Food applications and phytopharmacy properties. **Trends in Food Science and Technology**, v.85, p. 287-306, 2019.
- SAMSON, R. A. et al. **Food and indoor fungi: Second Edition**. 2 ed. Utrecht, The Netherlands: Ed. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2010.
- SHAHABADI, N. et al. Cytotoxicity and antibacterial activities of new chemically synthesized magnetic nanoparticles containing eugenol. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.49, p. 113-122, 2019.
- SHAHI, S. K. et al. Use of essential oil as botanical-pesticide against post harvest spoilage in *Malus pumilo* fruits. **BioControl**, v.48, n. 2, p. 223-232, 2003.
- SHARMA, K. et al. Synergistic antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of some selected medicinal plants in combination and with synthetic compounds. **Industrial Crops and Products**, v.154, 2020.
- SHARMA, P. R. et al. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. **Chemico-Biological Interactions**, v.179, n. 2-3, p. 160-168, 2009.
- SHIRURKAR, D. D.; WAHEGAONKAR, N. K. Antifungal activity of selected plant derived oils and some fungicides against seed borne fungi of maize. **European Journal of Experimental Biology**, v.2, p. 1693-1696, 2012.
- SILOU, T. et al. Aromatic Plants from Plateau des Cataractes: Occurrence of the Citronella Chemotype of *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) W.Watson Acclimatized in Congo-Brazzaville. **Chemistry and Biodiversity**, v.16, n. 2, 2019.
- SILVA, J. L. d. et al. Essential oil of *Cymbopogon flexuosus*, *Vernonia polyanthes* and potassium phosphite in control of bean anthracnose. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.9, p. 243-253, 02/25 2015.
- SIMÕES, M. C. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. Artmed
- SKARIA, B. P. et al. Lemongrass. *In*: **Handbook of Herbs and Spices**, 2012. p. 348-370.
- SOTO, K. M. et al. Antimicrobial effect of nisin electrospun amaranth: pullulan nanofibers in apple juice and fresh cheese. **Int J Food Microbiol**, v.295, p. 25-32, Apr 16 2019.
- SRINIVASAN, S. et al. Solution spraying of poly(methyl methacrylate) blends to fabricate microtextured, superoleophobic surfaces. **Polymer**, v.52, n. 14, p. 3209-3218, 2011.
- STAHL-BISKUP, E.; VENSKUTONIS, R. P. Thyme. *In*: **Handbook of Herbs and Spices: Second Edition**, 2012. v. 1, p. 499-525.
- STATSOFT, INC. **Statistica (data analysis software system)**. Versão 7. E.U.A: STATSOFT, INC, 2007.
- TALIBI, I. et al. Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases. **J Appl Microbiol**, v.117, n. 1, p. 1-17, Jul 2014.

R Core Team. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: R Core Team, 2017.

THAKUR, N. S. et al. *Melia dubia* Cav. spatial geometries influence the growth, yield and essential oil principles content of *Cymbopogon flexuosus* (Nees Ex Steud.) W. Watson. **Agroforestry Systems**, v.94, n. 3, p. 985-995, 2020.

THIELMANN, J.; MURANYI, P. Review on the chemical composition of *Litsea cubeba* essential oils and the bioactivity of its major constituents citral and limonene. **Journal of Essential Oil Research**, v.31, n. 5, p. 361-378, 2019.

TONGNUANCHAN, P. et al. Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils. **Journal of Food Engineering**, v.117, n. 3, p. 350-360, 2013.

TRINDADE, H. et al. Chemotypes and terpene synthase genes in *Thymus* genus: State of the art. **Industrial Crops and Products**, v.124, p. 530-547, 2018.

UNALAN, I. et al. Evaluation of electrospun poly(epsilon-caprolactone)/gelatin nanofiber mats containing clove essential oil for antibacterial wound dressing. **Pharmaceutics**, v.11, n. 11, Nov 1 2019.

USDA. United States Department of Agriculture. **Citrus: World Markets and Trade**. 2019. Disponível em: <https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/w66343603/1j92gk610/tx31qw072/Citrus.pdf>. Acesso em: Date Accessed

VAFANIA, B. et al. Nanoencapsulation of thyme essential oil in chitosan-gelatin nanofibers by nozzle-less electrospinning and their application to reduce nitrite in sausages. **Food and Bioproducts Processing**, v.116, p. 240-248, 2019.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v.11, p. 463-471, 1963.

VINCIGUERRA, V. et al. Chemical characterization and antifungal activity of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* essential oils and carvacrol against *Malassezia furfur*. **Natural Product Research**, v.33, n. 22, p. 3273-3277, 2019.

WEISANY, W. et al. Nano silver-encapsulation of *Thymus daenensis* and *Anethum graveolens* essential oils enhances antifungal potential against strawberry anthracnose. **Industrial Crops and Products**, v.141, 2019.

WU, Y.-W. et al. Volatility-dependent 2D IR correlation analysis of traditional Chinese medicine 'Red Flower Oil' preparation from different manufacturers. **Journal of Molecular Structure**, v.882, n. 1-3, p. 107-115, 2008.

XIN, Z. et al. Isolation of antofine from *Cynanchum atratum* BUNGE (Asclepiadaceae) and its antifungal activity against *Penicillium digitatum*. **Postharvest Biology and Technology**, v.157, 07/25 2019.

YADAV, R.; BALASUBRAMANIAN, K. Polyacrylonitrile/*Syzygium aromaticum* hierarchical hydrophilic nanocomposite as a carrier for antibacterial drug delivery systems. **RSC Advances**, v.5, n. 5, p. 3291-3298, 2015.

YAHYAZADEH, M. et al. Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, n. 8, p. 1445-1450, 2008/08/01 2008.

YAHYAZADEH, M. et al. Control of *Penicillium* decay on citrus fruit using essential oil vapours of thyme or clove inside polyethylene and nano-clay polyethylene films. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.84, n. 4, p. 403-409, 2009.

YAO, Z.-C. et al. Encapsulation of rose hip seed oil into fibrous zein films for ambient and on demand food preservation via coaxial electrospinning. **Journal of Food Engineering**, v.191, p. 115-123, 2016.

YILMAZ, A. et al. A novel antifungal surface-coating application to limit postharvest decay on coated apples: Molecular, thermal and morphological properties of electrospun zein–nanofiber mats loaded with curcumin. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.37, p. 74-83, 2016.

YOUNES, H.; COHN, D. Phase separation in poly(ethylene glycol)/poly(lactic acid) blends. **European Polymer Journal**, v.24, p. 765–773, 1988.

YUE, T. T. et al. Electrospinning of carboxymethyl chitosan/polyoxyethylene oxide nanofibers for fruit fresh-keeping. **Nanoscale Res Lett**, v.13, n. 1, p. 239, Aug 15 2018.

ZONG, X. et al. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. **Polymer**, v.43, n. 16, p. 4403-4412, 2002/07/01/ 2002.